

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2016년 3월 3일 (03.03.2016)



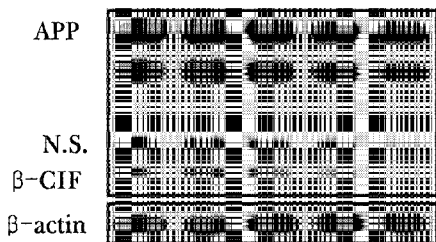
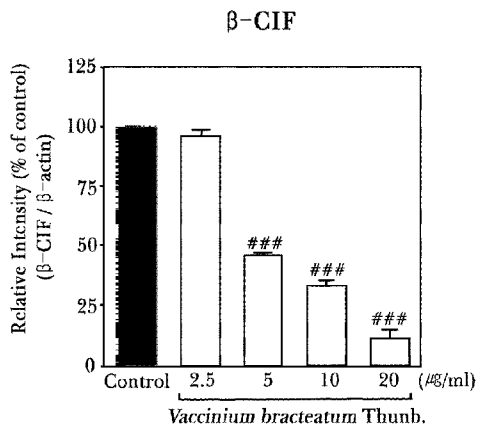
(10) 국제공개번호  
WO 2016/032249 A1

- (51) 국제특허분류: *A61K 36/45* (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/008976
- (22) 국제출원일: 2015년 8월 27일 (27.08.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2014-0112667 2014년 8월 27일 (27.08.2014) KR
- (71) 출원인: **성균관대학교 산학협력단 (RESEARCH BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY)** [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 성균관대학교내, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: **장춘곤 (JANG, Choon Gon)**; 16505 경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6112 동 3803 호, Gyeonggi-do (KR). **권승환 (KWON, Seung Hwan)**; 03438 서울시 은평구 가좌로 12길 15, 102 동 1203 호, Seoul (KR). **최상호 (CHOI, Sang Ho)**; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **이중구 (LEE, Joong Ku)**; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 06302 서울시 강남구 양재천로 163 STX R&D 센터 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING *VACCINIUM BRACTEATUM* THUNB. EXTRACT OR FRACTION THEREOF AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTING OR TREATING NEUROINFLAMMATION OR NEURO-DEGENERATIVE DISEASES

(54) 발명의 명칭: 모새나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition and a food composition containing *Vaccinium bracteatum* Thunb. extract or a fraction thereof as an active ingredient for preventing, treating or ameliorating neuroinflammation or neuro-degenerative diseases. The *Vaccinium bracteatum* Thunb. extract or a fraction thereof according to the present invention is derived from a natural product which has been in use as a natural medicinal ingredient, and as such, has no side effects and inhibits expression of NO, PGE<sub>2</sub>, iNOS and/or COX-2 genes or protein, which are factors associated with inflammation, and is additionally superbly effective for increasing and improving memory and the ability to learn, and thus can be beneficially used to prevent or treat neuroinflammation or neuro-degenerative diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방, 치료 또는 개선용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 모새나무 추출물 또는 이의 분획물은 천연약재로 사용되어온 천연물에서 유래되어 부작용이 없으면서도, 염증관련 인자인 NO, PGE<sub>2</sub>, iNOS 및/또는 COX-2 유전자 또는 단백질의 발현을 억제할 뿐만 아니라, 학습 또는 기억력 증진 및 개선 효과가 우수하므로 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료에 있어 유용하게 사용될 수 있다.



WO 2016/032249 A1

**공개:**

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 명세서

발명의 명칭: 모새나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

### 기술분야

[1] 본 발명은 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방, 치료 또는 개선용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

[2]

### 배경기술

[3] 염증 반응은 조직(세포)의 손상이나 외부감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)에 감염되었을 때 국소 혈관과 체액 중 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개물질 분비, 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종, 발열, 통증 등 외적 증상을 나타낸다. 정상인 경우 염증 반응은 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체 기능회복작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나 내부물질이 원인이 되어 염증반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 오히려 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 이끈다.

[4]

[5] 최근 염증반응이 신경퇴행을 유발하는 주요 기전의 하나라는 사실이 밝혀지고 있다. 즉 중추신경계에 존재하는 면역세포인 소신경교세포는 다양한 외인성, 내인성 물질로 인해 활성화될 수 있으며, 활성화된 소신경교세포는 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ , 일산화질소, 프로스타글란딘, 초과산화물 등의 물질을 생산, 방출한다(Gao 등, *J Neurochem*, 81, 1285-97, 2002; Nelson, PT. 등, *Ann Med*, 34, 491-500, 2002; Griffin, W.S. 등, *J Neuroinflammation*, 3, 5, 2006). 이러한 물질들의 생성은 단기적으로는 면역반응을 유발하지만, 그 과도한 생산이나 지속적인 생산은 근접한 신경세포들의 사멸을 유도하여 결국 신경퇴행을 유발한다는 것이다. 또 사멸 중인 신경세포가 방출하는 물질들이 소신경교세포의 활성을 다시 유발하게 되므로, 신경퇴행은 지속적인 악순환에 빠지게 된다. 실제로 소신경교세포의 활성이 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 크로이츠펠트야콥병(Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD), 다발성 경화증 등의 다양한 퇴행성 신경질환과 관계가 있음이 보고된 바 있다.

[6]

[7] 이와 같이 퇴행성 뇌신경 질환에서의 신경염증성 반응의 중요성을 고려한다면, 이러한 소신경교세포 내에서 전염증성 매개 인자들의 발현 수준을 감소시킴으로써 신경염증 및 이로부터 발병될 수 있는 퇴행성 뇌신경 질환을

치료할 수 있다 할 것이다.

[8]

[9] 한편, 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.)는 해변의 산지에서 자라는 난대성 상록활엽수로 11~12월에 열매가 성숙하는 특징을 가지고 있어 겨울철에 식용할수 있는 종이다. 종래에 모새나무의 과실은 남축자, 뿌리는 남축근, 잎은 남축엽이라 하여 약용으로 사용되기도 하였다. 모새나무 추출물과 관련하여는 피부미백용도에 대하여는 개시된 바 있으나(대한민국등록특허 제10-1230644호), 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용도에 대하여는 아직까지 알려진 바가 없다.

[10]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

[11] 본 발명자들은 치매 예방 및 치료할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 및 노력한 결과, 모새나무 추출물 또는 이의 분획물이 신경염증 반응을 억제할 뿐만 아니라, 학습 또는 기억력 증진 및 개선 효과를 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[12]

### 과제 해결 수단

[13] 본 발명의 목적은 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 모새나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 모새나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 학습 능력 또는 기억력 증진 또는 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

[16]

### 발명의 효과

[17] 본 발명의 모새나무 추출물 또는 이의 분획물은 천연약재로 사용되어온 천연물에서 유래되어 부작용이 없으면서도, 염증관련 인자인 NO, PGE<sub>2</sub>, iNOS 및/또는 COX-2 유전자 또는 단백질의 발현을 억제할 뿐만 아니라, 학습 또는 기억력 증진 및 개선 효과가 우수하므로 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료에 있어 유용하게 사용될 수 있다.

[18]

### 도면의 간단한 설명

[19] 도 1은 SH-SY5Y 신경세포주에서의 모새나무 메탄올 추출물 처리에 의한 뇌신경세포 보호 효과를 나타낸 도이다.

- [20] 도 2는 BV-2 소교세포에서의 모새나무 메탄올 추출물 처리에 의한 NO 생성 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [21] 도 3은 BV-2 소교세포에서의 모새나무 메탄올 추출물 처리에 의한 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [22] 도 4a 및 도 4b는 BV-2 소교세포에서의 모새나무 메탄올 추출물 처리에 의한 iNOS 단백질 및 mRNA 발현 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [23] 도 5a 및 도 5b는 BV-2 소교세포에서의 모새나무 메탄올 추출물 처리에 의한 COX-2 단백질 및 mRNA 발현 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [24] 도 6은 SH-SY5Y 신경세포주에서 모새나무 메탄올 추출물 처리에 의한  $\beta$ -CTF 발현 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [25] 도 7a 및 도 7b는 SH-SY5Y 신경세포주에서 모새나무 메탄올 추출물 처리에 의한 BACE1 발현 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [26] 도 8a 및 도 8b는 Y-미로실험을 통한 모새나무 추출물 또는 이의 분획물의 작업기억력 증진 효과를 나타낸 도이다.
- [27] 도 9a 및 도 9b는 스코폴아민 유도 건망증모델에서의 Y-미로실험을 통한 모새나무 추출물 또는 이의 분획물의 작업기억력 개선 효과를 나타낸 도이다.
- [28] 도 10a 및 도 10b는 수동회피실험을 통한 모새나무 추출물 또는 이의 분획물의 학습 및 기억력 증진 효과를 나타낸 도이다.
- [29] 도 11a는 도 11b는 스코폴아민 유도 건망증모델에서의 수동회피실험을 통한 모새나무 추출물 또는 이의 분획물의 학습 및 기억력 개선 효과를 나타낸 도이다.
- [30] 도 12는 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 유도 치매모델에서의 Y-미로실험을 통한 모새나무 추출물의 작업기억력 개선 효과를 나타낸 도이다.
- [31] 도 13은 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 유도 치매모델에서의 수동회피실험을 통한 모새나무 추출물의 학습 및 기억력 개선 효과를 나타낸 도이다.

[32]

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [33] 본 발명은 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [34]
- [35] 구체적으로, 본 발명의 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 모새나무 추출물 및/또는 이의 분획물을 포함할 수 있다.
- [36]
- [37] 본 발명에서 "모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.)"는 해변의 산지에서 자라는 난대성 상록활엽수로, 11~12월에 열매가 성숙하는 특징을 가지고 있어 겨울철에 식용할 수 있는 식물종이다. 모새나무는 높이가 1~3m까지 자라며

한국, 일본, 중국 등지에 분포하고, 우리나라에서는 제주도, 전남과 전북지역의 도서, 월출산 등지에 자생한다. 꽃은 홍자색으로 6월에 피고, 검은 열매는 6월에 열리며, 둥글고 하얀 가루로 덮여져 있다. 또한 모새나무의 과실은 남축자, 뿌리는 남축근, 잎은 남축엽이라 하여 약용으로 사용되기도 한다.

- [38] 본 발명에서 "모새나무 추출물"은 모새나무를 추출하여 수득한 추출물이다. 상기 모새나무 추출물은 모새나무 분쇄물을 건조 중량의 약 2 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 5배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올 및 부탄올 등과 같은 탄소수 1(C<sub>1</sub>) 내지 4(C<sub>4</sub>)의 저급 알콜의 극성 용매 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매를 용출 용매로써 사용하고, 추출 온도는 20 내지 100°C, 바람직하게는 실온에서, 추출 기간은 약 12시간 내지 4일, 바람직하게는 3일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여 추출할 수 있으나, 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료 활성이 있는 물질을 추출하는 방법이라면 제한없이 이용될 수 있다. 바람직하게는 냉침추출로 1회 내지 5회 연속 추출하여 감압여과하고, 그 여과추출물을 진공회전농축기로 20 내지 100°C, 바람직하게는 실온에서 감압 농축하여 물, 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 모새나무 조추출물을 수득한 결과물이 될 수 있으나, 본 발명의 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료 활성을 나타낼 수 있는 한, 이에 제한되지는 않고, 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물을 모두 포함할 수 있다. 상기 모새나무 추출물은 천연, 잡종, 변종식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어, 뿌리, 지상부, 줄기, 가지, 잎, 열매 또는 식물 조직 배양물 등으로부터 추출 가능하다.

- [39] 본 발명에서 "분획물"은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물이다. 본 발명의 모새나무 분획물은 모새나무 추출물을 현탁한 후, 물, 메탄올, 에탄올 등의 극성 용매 또는 헥산, 에틸아세테이트와 같은 비극성 용매를 사용하여 분획함으로써 극성 용매 분획물과 비극성 용매 분획물을 각각 수득할 수 있다. 구체적으로, 모새나무 조추출물을 증류수 등에 현탁한 후, 현탁액의 약 1 내지 100배, 바람직하게는 약 1 내지 5배 부피의 물, 탄소수 1(C<sub>1</sub>) 내지 4(C<sub>4</sub>)의 알코올, 클로로포름, 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올 또는 이들의 혼합용매와 같은 극성 또는 비극성 용매를 가하여 1회 내지 10회, 바람직하게는 2회 내지 5회에 걸쳐 극성 또는 비극성 용매 가용층을 추출, 분리하여 수득할 수 있다.

- [40] 또한 본 발명의 분획물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행하여 수득한 것일 수도 있다(Harborne J.B. Plant Pathology, 1998, 3rd Ed. p6-7). 예컨대, 본 발명에 따른 모새나무 추출물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획물, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등으로 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 활성분획물도 본 발명의 모새나무 분획물에

포함된다.

- [41] 상기 활성분획물은 분획물로부터 보다 높은 생리활성 등을 가지는 분획을 분리한 것으로, 활성분획 또는 유효분획물이라고도 한다. 계통분획과 같은 통상의 분획과정을 통해 수득한 여러 성분이 혼합되어 있는 분획물 가운데 농도구배 컬럼 크로마토그래피 등을 통하여 활성성분의 성질에 따라 분리해냄으로써 보다 강한 활성을 갖는 특정 활성분획물을 제조할 수 있다. 상기 컬럼 크로마토그래피는 실리카겔, 세파덱스, LH-20, ODS 겔, RP-18, 폴리아미드, 도요펄(Toyopearl) 및 XAD 수지로 이루어진 균으로부터 선택된 충진제를 이용하는 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 활성분획물을 분리 및 정제할 수 있고, 컬럼 크로마토그래피는 필요에 따라 적절한 충진제를 선택하여 수차례 실시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 크로마토그래피를 사용함에 있어 용출용매, 용출 속도 및 용출시간은 당업계에서 일반적으로 사용하는 용매, 속도 또는 시간을 적용할 수 있다.
- [42] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 얻어진 모세나무 메탄올 추출물에 증류수를 가하여 현탁한 후 동량의 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 층과 물 층으로 분리하였고, 이를 여과, 감압농축하여 에틸아세테이트 분획물을 수득하였다. 그런 다음, 상기 에틸아세테이트 분획물을 제거하고 남은 물 층에 부탄올을 동량 가하여 상기와 동일한 방법으로 부탄올 분획물을 수득하였고, 남은 물층을 농축하여 물 분획물을 수득하였다(실시예 1 및 실시예 2).
- [43]
- [44] 본 발명에 따른 모세나무 추출물 또는 이의 분획물은 염증관련 인자로 알려진 일산화질소(NO), 프로스타글란딘(PGE<sub>2</sub>), iNOS 및/또는 COX-2 유전자 또는 단백질의 발현을 억제함으로써 신경염증 또는 이로부터 발병할 수 있는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있다.
- [45]
- [46] 본 발명에서 "신경염증"은 신경계, 즉 신경세포, 신경조직 등에 발생하는 염증성 반응을 총칭한다. 중추신경계에 존재하는 면역세포인 소신경교세포가 다양한 외인성, 내인성 물질로 인해 활성화되어, 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ , 일산화질소, 프로스타글란딘, 초과산화물 등의 물질을 생산, 방출하는 현상을 포함할 수 있다. 이러한 물질들의 생성은 단기적으로는 면역반응을 유발하지만, 그 과도한 생산이나 지속적인 생산은 근접한 신경세포들의 사멸을 유도하여 결국 신경퇴행을 유발한다고 알려져 있다.
- [47] 본 발명의 일 실험예에서는 모세나무의 추출물 또는 이의 분획물이 신경세포에 대한 독성을 갖지 않으면서, 염증관련 인자로 알려진 NO, PGE<sub>2</sub>, iNOS 및 COX-2의 단백질 또는 mRNA의 발현수준을 억제하였음을 확인함으로써 신경염증의 예방 또는 치료효과를 확인하였다(실험예 2).
- [48]
- [49] 또한, 본 발명에 따른 모세나무 추출물 또는 이의 분획물은 알츠하이머 관련

효소로 알려진  $\beta$ -CTF 및 베타-세크리테아제(BACE1)의 발현을 억제함으로써 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용도로 사용될 수 있다.

- [50] 본 발명에서 "퇴행성 뇌신경 질환"은 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 여러 가지 증상을 유발하는 질환을 총칭하며, 구체적으로 인지 기능, 학습 또는 기억력이 손상되거나, 신경염증 반응을 동반하는 뇌신경 질환을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 대표적인 퇴행성 뇌신경 질환에는 치매(dementia), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD), 뇌졸중(Stroke), 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 인지 장애, 학습 장애, 기억력 손상 등이 있다.
- [51] 이 중에서 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 노인성 치매 중에서도 가장 중요하게 대두되고 있는 질환으로, 아밀로이드베타(amyloid beta, A $\beta$ )의 뇌내 축적과 그로 인한 신경독성이 발병의 중요한 원인으로 알려져 있다. 상기 A $\beta$ 는 아밀로이드 전구체(amyloid precursor protein, APP)가 막단백 가수분해 효소인 베타-세크리테아제 1(BACE1)와 감마-세크리테아제의 연속적인 작용으로 만들어지는 것으로 알려져 있으며, 따라서 BACE1 단백질의 발현 억제를 통해 알츠하이머 병을 예방 또는 치료할 수 있음은 자명하다.
- [52]
- [53] 본 발명의 일 실험예에서는 알츠하이머 관련 유전자로 알려진  $\beta$ -CTF( $\beta$ -secretase-cleaved carboxyl-terminal fragment)와 BACE1(Beta-secretase 1, beta-site APP-cleaving enzyme 1)의 단백질 또는 mRNA의 발현수준 또한 억제시킴을 확인함으로써 퇴행성 뇌신경 질환이 예방 또는 치료효과를 확인하였다(실험예 3).
- [54]
- [55] 본 발명에서 "예방"은 상기 조성물의 투여로 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말하며, "치료"는 상기 조성물에 의해 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다.
- [56] 본 발명의 모세나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 모세나무 추출물 또는 이의 분획물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 99 중량%로, 바람직하게는 0.01 중량% 내지 50 중량%를 포함할 수 있다.
- [57] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제,

증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[58]

[59] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[60]

[61] 본 발명에서 상기 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 의심 개체는 상기 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물을 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다. 상기 약학적 조성물 및 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[62] 본 발명에서 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 의심 개체에 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것으로서, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[63] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[64] 본 발명에서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를

얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [65] 본 발명의 약학적 조성물은 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환을 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 것이든 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물, 인간, 조류 및 어류 등 어느 것이나 사용할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 비 경구, 피하, 복강 내, 폐 내 및 비강 내로 투여될 수 있고, 국부적 치료를 위해, 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의하여 투여될 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [66] 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.
- [67]
- [68] 또 다른 양태로서, 본 발명은 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [69]
- [70] 상기 모새나무, 이의 추출물, 분획물 및 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [71] 본 발명에서 "개선"은 모새나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 예방 또는 치료되는 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환과 같은 질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [72] 구체적으로, 본 발명의 모새나무 추출물 또는 이의 분획물을 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 식품 조성물에 첨가할 수 있다.
- [73] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함할 수 있으며, 본 발명의 모새나무 추출물 또는 이의 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없으며, 예를 들어 각종 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [74] 상기 식품 조성물에는 모새나무 추출물 또는 이의 분획물 이외에도 다른 성분을 추가할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있으며, 이에 제한되지

않는다.

- [75] 상기 "식품보조첨가제"는 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소로서, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가될 수 있으며 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 향진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [76] 상기 천연 탄수화물의 예는 포도당, 과당 등의 단당류; 말토스, 수크로스 등의 이당류; 및 텍스트린, 시클로텍스트린 등의 다당류와, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이 있으며, 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴 등), 스테비아 추출물(레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [77] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능성 식품이 포함될 수 있다. 상기 "건강기능성 식품"은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 기능성이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다. 본 발명의 건강기능성 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어날 수 있다.
- [78] 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품의 제조 시에 본 발명의 모세나무 추출물 또는 이의 분획물은 원료 조성물 중 1 내지 50 중량%, 바람직하게는 5 내지 10 중량%의 양으로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.
- [79] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능성 식품을 모두 포함할 수 있다.
- [80]
- [81] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 모세나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 학습 능력 또는 기억력 증진 또는

개선용 조성물을 제공한다.

[82]

[83] 상기 모새나무, 이의 추출물, 분획물에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[84]

본 발명의 일 실험예에서는 마우스 모델을 대상으로 모새나무 추출물 또는 이의 분획물을 투여한 결과, Y-미로실험에서의 작업기억 증진효과 및 수동회피실험에서의 기억력 증진효과를 확인하였다. 따라서 본 발명의 모새나무 추출물 또는 이의 분획물은 학습 능력 또는 기억력 증진용으로 사용될 수 있으며, 상기 조성물은 약학적 조성물, 의약품 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.

[85]

[86]

또한, 본 발명은 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물 또는 식품 조성물의 제조를 위한, 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공한다.

[87]

[88]

또한, 본 발명은 학습 능력 또는 기억력 증진 또는 개선을 위한 식품 조성물의 제조를 위한, 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공한다.

[89]

[90]

또한, 본 발명은 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 추출물 또는 이의 분획물을 이를 필요로 하는 개체에 투여함으로써 개체의 학습 능력 또는 기억력을 증진 또는 개선시키는 방법을 제공한다.

[91]

### 발명의 실시를 위한 형태

[92]

이하, 실시예를 통해 본 발명의 구성 및 효과를 보다 더 구체적으로 설명하고자 하나, 이들 실시예는 본 발명의 예시적인 기재일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

[93]

[94]

#### **1. 약물 및 시약**

[95]

Amyloid beta<sub>25-35</sub> (A $\beta$ <sub>25-35</sub>), Dimethyl sulfoxide (DMSO), 30% 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), lipopolysaccharide, phosphoric acid, poly-D-lysine, 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride), sulphanilamide, Tween-20, scopolamine 및 anti- $\beta$ -actin 항체는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)의 것을 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)는 Hyclone (Logan, UT, USA)사의 것을 사용하였다. Fetal bovine serum (FBS), 0.25% trypsin-EDTA 및 penicillin/streptomycin mixture는 GIBCO-BRL (Grand Island, NA, USA)사의 것을 사용하였다. Rabbit anti-rabbit horseradish peroxidase-linked IgG 항체들은 Cell Signaling (Boston, MA, USA)사의

것을 사용하였다. Rabbit anti-APP, rabbit anti-BACE1, rabbit anti-COX-2 그리고 rabbit anti-iNOS 항체들은 Epitomics (Burlingame, CA, USA), TRIZOL, cDNA 합성 kit는 Invitrogen (MolecularProbes, OR, USA)사의 것을 사용하였다. PGE2 ELISA kit (Cayman, MI, USA)것을 사용하였다. 그 밖에 실험에 사용된 시약들은 최상의 제품의 것을 구매하여 사용하였다.

[96]

[97] **2. 실험동물의 준비**

[98] 4주령의 ICR계 수컷 마우스 (25-30 g)를 코아텍 (경기, 대한민국)에서 공급받아 성균관대학교 약학대학의 동물 사육실에서 1주일 이상 사육하여 적응시켜 사용하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 온도 ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), 습도 ( $55 \pm 10\%$ ) 및 명암주기 (12 시간)는 자동으로 조절되도록 하였다.

[99]

[100] <A $\beta_{25-35}$  유도 치매모델 제작>

[101] A $\beta_{25-35}$ 를 최종 농도 1 mM의 saline에 녹여 37°C에 5일 동안 활성화시킨 후, 상기 4주령의 ICR계 수컷 마우스 (25-30 g)를 엔토발로 마취 후, 입체정위기구 (stereotaxic apparatus)를 이용하여 좌측 뇌실에 6 nmol/3 $\mu\text{l}$ 의 A $\beta_{25-35}$ 를 주사하였다. 주사 후, 회복을 위해서 37°C 이상의 보온 하에 실험동물을 안정화시켰다.

[102]

[103] **3. 세포배양**

[104] 인간신경아세포종 SH-SY5Y 세포, SH-SY5Y swedish 형질전환 세포 및 마우스 BV-2 소교세포는 불활성화시킨 10% 태아우혈청 (fetal bovine serum, FBS)과 항생제가 함유된 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium, Hyclone, Thermo, USA) 배지 하에서 배양하였다. 배양기를 37°C 온도로 유지했고, 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub>가 혼합된 기체를 계속 공급하여 세포배양의 적절한 조건을 갖추었다. 세포는 6, 24, 그리고 96-웰 플레이트에  $2.5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$ , 그리고  $1 \times 10^6$ 세포를 실험 24시간 전에 배양하였다. 과산화수소는 400  $\mu\text{M}$ 로 결정하였으며 LPS는 100ng/ml로 결정하였다. 모세나무 메탄올 추출물은 100% DMSO에 녹였으며, 최종농도 0.1% 이하로 사용하였다.

[105]

[106] **4. 통계처리**

[107] 모든 실험 결과는 ANOVA (one way analysis of variance)를 이용하여 통계 처리하였고, 유의성이 검증될 경우 Newman-Keuls test를 사용하여  $p < 0.05$  수준 이하에서 유의성 검정을 실시하였다.

[108]

[109] **실시예 1: 모세나무 메탄올 추출물의 제조**

[110] 중국 운남성에서 채취한 모세나무의 음건된 것을 (분양번호, FBM014-092) 한국생명공학연구원 해외생물소재허브센터에서 분양하여 사용하였다. 건조된

모새나무 300g를 완전히 건조시킨 후 분쇄하여 모새나무 300g을 95% 메탄올 3L에 85°C 온도에서 3번 반복하여 추출한 다음 이를 감압농축기 (EYELA사, N-1000, 일본)로 감압농축한 후, 동결 건조하여 모새나무 메탄올 조추출물 112g을 수득하였다.

[111]

[112] 실시예 2: 모새나무 분획물의 제조

[113]

[114] 실시예 2-1: 모새나무 에틸아세테이트 분획물의 제조

[115] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 모새나무 300 g에서 얻은 모새나무 메탄올 추출물 중 40 g을 물 1L에 현탁한 후 에틸아세테이트(EtAc) 1L에 2회 걸쳐 추출하여 에틸아세테이트 가용 분획물 6.5 g을 수득하였다.

[116]

[117] 실시예 2-2: 모새나무 부탄올 분획물의 제조

[118] 상기 실시예 2-1에서 분획하고 난 물층에 다시 부탄올(BuOH) 1L에 2회 걸쳐 추출하여 부탄올 가용 분획물 6.8 g을 수득하였다.

[119]

[120] 실시예 2-3: 모새나무 물 분획물의 제조

[121] 상기 실시예 2-2에서 얻은 모새나무 부탄올 가용 분획물을 분획하고 난 물층을 농축하여 물 분획물 16.03 g을 수득하였다.

[122]

[123] 상기 모새나무 추출물 및 분획물들은 각각 열수 처리하여 감압 농축하여 실험에 사용하였다.

[124]

[125] 실험예 1: 모새나무 추출물의 신경세포 보호 효과

[126] 모새나무 추출물의 처리에 의한 신경세포(SH-SY5Y) 생존율을 측정하기 위해 MTT 환원 어세이를 사용하였다. 실험을 수행한 96-웰 플레이트에 MTT 용액을 최종농도 0.5mg/ml가 되도록 각 웰에 넣었다. 배양기에서 2시간 동안 반응시키고 배지와 MTT 용액을 제거한 후, DMSO를 넣어 교반하였다. 완전히 용해되었을 때 마이크로플레이트 판독기(Molecular device, USA)를 이용하여 540nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

[127] 측정된 흡광도 값을 다음 수학적식에 대입하여 세포 생존율을 계산하였다.

[128] [수학적식 1]

[129]

$$\text{세포 생존율}(\%) = \frac{\text{대조군 } O.D. - \text{시험군 } O.D.}{\text{대조군 } O.D.} \times 100$$

[130]

[131] 그 결과, 모새나무 추출물의 처리없이 과산화수소만 처리한 세포의 생존율은 40%로 현저히 감소하였으나, 모새나무 추출물을 처리한 결과 추출물의 용량

의존적으로 세포 생존율이 증가하였음을 확인하였고, 이는 모새나무 추출물의 유의적인 신정보호효과를 시사한다(도 1).

[132]

[133] **실험예 2: 모새나무 추출물의 항염증 효과**

[134]

[135] **실험예 2-1: 모새나무 추출물의 일산화질소(NO) 억제 효과**

[136] 모새나무 추출물의 항염증 효능을 확인하기 위하여 염증매개물질인 NO의 생산량을 정량적으로 측정하였다. 구체적으로,  $2.5 \times 10^5$ 개의 BV-2 소교세포를 24-웰 플레이트에 실험 24시간 전에 분주하여 신경염증 유발물질인 LPS 100 ng/ml와 상기 실시예 1에서 제조한 모새나무 추출물을 농도별로 첨가한 후 배양기에서 24시간 동안 반응시키고, 각각 50  $\mu$ l의 그리스 시약(Griess reagent; 1% sulfonilamine/0.1% N-(1-naphtyl)-ethylenediamine dihydrochloride/5% 인산)을 첨가한 다음 15분 동안 반응시켰다. 이후 마이크로플레이트 판독기(Molecular device, USA)를 이용하여 540nm 파장에서 신경염증 반응 억제 효과를 측정하였다.

[137] 그 결과, BV-2 소교세포에서 LPS 처리에 의해 NO 생성량이 현저히 증가하였고, LPS에 의해 현저하게 증가된 NO 생성량은 모새나무 추출물의 용량 의존적으로 억제되었음을 확인하였다(도 2).

[138]

[139] **실험예 2-2: 모새나무 추출물의 프로스타글란딘E2 (PGE<sub>2</sub>) 억제 효과**

[140] 모새나무 추출물의 항염증 효능을 확인하기 위하여 염증매개물질인 PGE<sub>2</sub>의 생산량을 정량적으로 측정하였다. 구체적으로, BV-2 소교세포는 24-웰 플레이트에  $2.5 \times 10^5$  세포를 실험 24시간 전에 분주하여 신경염증 유발물질인 LPS 100 ng/ml와 상기 실시예 1에서 제조한 모새나무 추출물을 농도별로 첨가한 후 배양기에서 24시간 동안 반응시키고, 24시간 뒤, 각각의 농도로 처리된 웰의 상층액을 수집하여 원심분리기를 이용하여 400 g, 3분간 침전시키고, PGE<sub>2</sub> ELISA kit를 사용하여 마이크로플레이트 판독기(Molecular device, USA)를 이용하여 490 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값을 standard curve의 정량 그래프를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 생성을 계산하였다.

[141] 그 결과, BV-2 소교세포에서 LPS 처리에 의해 PGE<sub>2</sub> 생성량이 현저히 증가하였고, LPS에 의해 현저하게 증가된 PGE<sub>2</sub> 생성량은 모새나무 추출물의 용량 의존적으로 억제되었음을 확인하였다(도 3).

[142]

[143] **실험예 2-3: 모새나무 추출물의 iNOS 및 COX-2 단백질 및 mRNA 발현 억제 효과**

[144] BV-2 소교세포에서 모새나무 추출물의 신경염증 관련된 단백질 그리고 mRNA 발현의 동정실험을 위해서 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 실험을 실시하였다. 실험을 수행한 6-웰 플레이트에 모새나무 추출물을 30분 동안 전처리를 한 뒤, LPS로

처리한 뒤, 6시간 또는 24시간 동안 배양기에서 반응시켰다. 6시간 또는 24시간 뒤, 각각의 농도로 처리된 웰의 상층액을 수집하여 원심분리기를 이용하여 400 g, 3분간 침전시키고, 세포는 차가운 PBS로 세척한 뒤, Tper 용해 버퍼(Thermo, USA) 100  $\mu$ l를 첨가하여 30분간 용해시켰다. 용해물들은 원심분리기를 이용하여, 10000 g, 4°C로 15분간 원심분리시켰으며, 원심분리 후 상층액은 실험을 위한 샘플로서 사용 전까지 70°C에서 보관하였다. 단백질은 BCA 정량분석 키트(Thermo, USA)를 이용하여 정량분석하였으며, 8% 내지 12%의 SDS 겔로 용출한 후 PVDF 막에 옮겼다. 단백질의 발현을 확인하기 위해, ECL (enhanced chmilumenescence)로 형광발색시켜 확인하는데, 먼저 5% 탈지분유로 막을 1시간 동안 반응시키며, 일차항체인 iNOS, COX-2 및  $\beta$ -actin으로 4°C에서 밤새 표지시켰으며, TTBS로 5회 세척한 다음 이차항체인 HRP (horseradish peroxidase)-conjugated anti-rabbit 그리고 anti-mouse 항체를 상온에서 1시간 동안 표지시켰다. 표지 후 10분간 TTBS를 이용하여 5회 세척하였고, 세척된 막은 ECL를 이용하여, x-ray 필름을 이용하여 발색시켰으며, 농도는 정량분석법에 따라 정량분석프로그램(Fujifilm, Japan)을 이용하여 분석하였다. 또한 mRNA의 발현을 확인하기 위해 TRIZOL (Invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였으며, cDNA 합성 kit(Invitrogen)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 상기 RT-PCR은 iNOS, COX-2 및  $\beta$ -actin의 프라이머를 사용하였고, 프라이머 서열을 하기 표 1에 나타내었다.

[145] [Table 1]

유전자	정방향프라이머	역방향프라이머	RT-PCR 산물크기 (bp)
iNOS	5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGG CAGCAGC-3(서열번호 1)	5'-GGCTGTCAGAGCCTCGT GGCTTTGG-3(서열번호 2)	497
COX-2	5'-TTGAAGACCAGGAGTAC AGC-3(서열번호 3)	5'-GGTACAGTTCCATGACA TCG-3(서열번호 4)	324
beta-actin	5'-AGCCATGTACGTAGCCAT CC-3(서열번호 5)	5'-GCTGTGGTGGTGAAGCT GTA-3(서열번호 6)	222

[146]

[147] 그 결과, LPS 처리에 의해 iNOS와 COX-2 단백질 및 mRNA의 발현 수준이 현저히 증가한 반면, 모새나무 추출물을 투여한 결과 이들 단백질 및 mRNA의 발현 수준이 현저히 감소함을 확인하였다(도 4 및 도 5).

[148]

[149] 실험예 3: 모새나무 추출물의 알츠하이머 관련 유전자 및 단백질 발현 억제효과

[150]

[151] SH-SY5Y swedish 형질전환 신경세포주에서 모새나무 추출물의 치매(알츠하이머 병) 관련된 단백질 및 mRNA 발현의 동정실험을 위해서  $\beta$ -CTF 및 BACE1에 대하여 각각 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 실험을 실시하였다. 실험을 수행한 6-웰 플레이트에 모새나무 추출물을 24시간 동안 전처리를 한 뒤, 배양기에서 반응시켰다. 24시간 뒤, 각각의 농도로 처리된 웰의 상층액을 수집하여 원심분리기를 이용하여 400 g, 3분간 침전시키고, 세포는 차가운 PBS로 세척한 뒤, Tper 용해 버퍼(Thermo, USA) 100  $\mu$ l를 첨가하여 30분간 용해시켰다. 용해물들은 원심분리기를 이용하여, 10000 g, 4°C로 15분간 원심분리시켰으며, 원심분리 후 상층액은 실험을 위한 샘플로서 사용 전까지 70°C에서 보관하였다.

[152] 단백질은 BCA 정량분석 키트(Thermo, USA)를 이용하여 정량분석하였으며, 12.5%의 SDS 겔로 용출한 후 PVDF 막에 옮겼다. 단백질의 발현을 확인하기 위해, ECL(enhanced chemiluminescence)로 형광발색시켜 확인하는데, 먼저 5% 탈지분유로 막을 1시간 동안 반응시키며, 일차항체인 APP,  $\beta$ -CTF, BACE1 및  $\beta$ -actin으로 4°C에서 밤새 표지시켰으며, TTBS로 5회 세척한 다음 이차항체인 HRP(horseradish peroxidase)-conjugated anti-rabbit 그리고 anti-mouse 항체를 상온에서 1시간 동안 표지시켰다. 표지 후 10분간 TTBS를 이용하여 5회 세척하였고, 세척된 막은 ECL를 이용하여, X-ray 필름을 이용하여 발색시켰으며, 농도는 정량분석법에 따라 정량분석프로그램(Fujifilm, Japan)을 이용하여 분석하였다.

[153]

[154] 한편, mRNA의 발현을 확인하기 위해 TRIZOL (Invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였으며, cDNA 합성 kit(Invitrogen)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 상기 RT-PCR은 BACE1 및  $\beta$ -actin의 프라이머를 사용하였고, 프라이머 서열을 하기 표 2에 나타내었다.

[155] [Table 2]

유전자	정방향프라이머	역방향프라이머	RT-PCR 산물크기 (bp)
BACE1	5'-CATTGGAGGTATCGACC ACTCGCT-3(서열번호 7)	5'-CCACAGTCTTCCATGTC CAAGGTG-3(서열번호 8)	624

[156]

[157] 그 결과,  $\beta$ -CTF( $\beta$ -secretase-cleaved carboxyl-terminal fragment) 단백질 발현수준은 처리한 모새나무 추출물의 용량 의존적으로 억제하였음을 확인하였다(도 6).

[158] BACE1 단백질 및 mRNA 발현수준 또한 처리한 모새나무 추출물의 용량

의존적으로 억제하였음을 확인하였다(도 7a 및 도 7b).

[159]

[160] 실험예 4: 모새나무 추출물 또는 이의 분획물의 작업기억력 증진 효과

[161]

[162] 실험예 4-1: Y-미로실험을 통한 모새나무 추출물 또는 이의 분획물의 작업기억력 증진 효과 확인

[163] 마우스를 각 군당 14 마리씩 4 군으로 나누었다. 제1군은 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수 투여군(대조군), 제2군 내지 제4군은 각각 모새나무 추출물 또는 이의 부탄을 가용 분획물 6.25, 12.5 및 25 mg/kg 투여군(실험군)으로 하였다.

[164] 모새나무 추출물 또는 이의 부탄을 가용 분획물을 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수에 용해시켜 6.25, 12.5 및 25 mg/kg의 용량으로 마우스에 경구투여하고, 1시간 후에 마우스를 Y-미로에 넣어 각각 A, B 및 C 가지에 마우스가 자유롭게 들어가는 것을 측정하였다. 이때, 새로운 가지에 들어가면 1점을 주게 되며, 교차행동 %는 하기 수학적 2에 의하여 계산하였다.

[165] [수학적 2]

[166]

$$\text{교차행동\%} = \frac{\text{세 가지에 모두 들어간 횟수}}{\text{각 가지에 들어간 총 횟수} - 2} \times 100$$

[167]

[168] 그 결과, 모새나무 추출물 또는 이의 부탄을 가용분획물을 투여하지 않은 제1군(대조군)의 마우스에 비하여 모새나무 추출물 또는 이의 부탄을 가용분획물을 투여한 제2군 내지 제4군(실험군)의 마우스에서 모새나무 추출물 또는 이의 부탄을 가용분획물의 농도 의존적으로 교차행동 비율을 증가시켰음을 확인하였다.

[169] 이는 Y-미로실험에서 작업기억 증진효능을 나타내는 결과로서, 상기 실험결과로부터 모새나무 메탄올 조추출물 및 이의 부탄을 가용분획물이 각각 마우스의 작업기억력을 현저히 증가시킬 수 있음을 확인하였다(도 8a 및 도 8b).

[170]

[171] 실험예 4-2: 스코폴라민 유도 건망증모델에서의 Y-미로실험을 통한 모새나무 추출물 또는 이의 분획물의 작업기억력 개선 효과 확인

[172] 마우스를 각 군당 14 마리씩 5 군으로 나누었다. 제1군은 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수 투여군(대조군), 제2군은 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수 및 스코폴라민 투여군(양성대조군), 제3군 내지 제5군은 모새나무 추출물 또는 이의 가용분획물(에틸아세테이트)의 투여군(실험군)으로 하였다.

[173] 모새나무 추출물을 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수에 용해시켜 6.25, 12.5 및 25 mg/kg의 용량으로 마우스에 경구투여하고, 30분 후에 스코폴라민 0.5 mg/kg을 피하주사 하였다. 또한 모새나무 추출물의 에틸아세테이트 분획물을

10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수에 용해시켜 12.5, 25 및 50 mg/kg의 용량으로 마우스에 경구투여하고, 30분 후에 스코폴라민 0.5 mg/kg을 피하주사하였다.

[174] 1시간 후에 마우스를 Y-미로에 넣어 A, B 및 C 가지에 마우스가 자유롭게 들어가는 것을 측정하였다. 이때, 새로운 가지로 들어가면 1점을 주게 되며, 교차행동 %는 하기 수학적 식 2에 의하여 계산하였다.

[175] [수학적 식 2]

$$[176] \quad \text{교차행동 \%} = \frac{\text{세 가지에 모두 들어간 횟수}}{\text{각 가지에 들어간 총 횟수} - 2} \times 100$$

[177]

[178] 그 결과, 스코폴라민을 투여하지 않은 제1군(대조군)의 마우스에 비하여 스코폴라민을 투여한 제2군(양성대조군)에서 교차행동 비율이 낮아짐으로써 건망증이 유도되었음을 확인하였다.

[179] 한편, 모새나무 추출물 또는 이의 에틸아세테이트 가용분획물을 투여한 제3군 내지 제5군(실험군)의 마우스에서 교차행동 비율을 증가시켰음을 확인하였다. 상기 실험결과를 통하여 모새나무 메탄올 조추출물 또는 이의 에틸아세테이트 가용 분획물이 기억력 손상을 효과적으로 예방할 수 있음을 확인하였다(도 9a 및 도 9b).

[180]

[181] 실험예 4-3: A $\beta$ <sub>25-35</sub> 유도 치매모델에서의 Y-미로실험을 통한 모새나무 추출물의 작업기억력 개선 효과 확인

[182] 마우스를 각 군당 11~12 마리씩 5 군으로 나누었다. 제1군은 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수 투여군(대조군), 제2군은 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수 및 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 투여군(양성대조군), 제3군 내지 제5군은 농도별 모새나무 추출물의 투여군(실험군)으로 하였다.

[183] 모새나무 추출물을 각각 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수에 용해시켜 6.25, 12.5 및 25 mg/kg의 용량으로 마우스에 경구투여하고, 1시간 후에 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 6 nmol을 좌측 뇌실에 입체정위 기구를 사용하여 주사하였다. 5일 동안 각각의 군들에 10% Tween 20을 포함하여 모새나무 추출물 6.25, 12.5 및 25 mg/kg을 투여하였다.

[184] 5일째 각각의 모새나무 추출물을 투여 1시간 후에 마우스를 Y-미로에 넣어 A, B 및 C 가지에 마우스가 자유롭게 들어가는 것을 측정하였다. 이때, 새로운 가지로 들어가면 1점을 주게 되며, 교차행동 %는 하기 수학적 식 2에 의하여 계산하였다.

[185] [수학적 식 2]

[186]

$$\text{교차행동\%} = \frac{\text{세 가지에 모두 들어간 횟수}}{\text{각 가지에 들어간 총 횟수} - 2} \times 100$$

[187]

[188] 그 결과, A $\beta_{25-35}$ 을 투여하지 않은 제1군(대조군)의 마우스의 교차행동 비율(72%)에 비하여 A $\beta_{25-35}$ 을 투여한 제2군(양성대조군)에서 교차행동 비율(53%)이 낮아짐으로써 치매가 유도되었음을 확인하였다( $p < 0.05$ ).

[189] 한편, 모새나무 메탄올 추출물 6.25 mg/kg 투여군, 12.5 mg/kg 투여군 및 25 mg/kg 투여군은 각각 71%, 65%, 및 64%의 교차행동 비율을 보여 A $\beta_{25-35}$  유도 치매모델군(양성대조군)에 비하여 현저히 교차행동 비율을 증가시켰음을 확인하였다.

[190] 상기 실험결과를 통하여 모새나무 추출물이 알츠하이머성 기억력 손상을 효과적으로 예방할 수 있음을 확인하였다(도 12).

[191]

[192] **실험예 5: 모새나무 추출물의 학습 및 기억력 증진 효과**

[193]

[194] 실험예 5-1: 수동회피실험을 통한 모새나무 추출물 또는 이의 분획물의 학습 및 기억력 증진 효과 확인

[195] 마우스를 각 군당 14 마리씩 4 군으로 나누었다. 제1군은 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수 투여군(대조군), 제2군 내지 제4군은 각각 모새나무 추출물 또는 이의 가용 분획물(에틸아세테이트, 부탄올, 물) 6.25, 12.5 및 25 mg/kg 투여군(실험군)으로 하였다.

[196] 모새나무 추출물 또는 이의 가용 분획물(에틸아세테이트, 부탄올, 물)을 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수에 용해시켜 6.25, 12.5 및 25 mg/kg의 용량으로 마우스에 경구투여하였다. 1시간 후에 마우스를 스텝-스루 (step-through) 장치에 넣어 어두운 상자로 들어가면 0.25mA의 전기 충격을 3초 동안 가하여 학습(training)시켰다. 24 시간 후에 마우스를 다시 밝은 상자에 넣어 검은 상자에 들어가기까지의 체재시간을 측정하여 학습 및 기억력의 지표로 하였다. 이때 마우스의 컷-오프 시간 (cut-off time)은 300초로 하여 대조군과 비교하였다.

[197]

[198] 그 결과, 모새나무 추출물 또는 이의 가용분획물을 투여하지 않은 제1군(대조군)의 마우스에 비하여 모새나무 추출물 또는 이의 가용분획물을 투여한 제2군 내지 제4군(실험군)의 마우스에서 모새나무 추출물 또는 이의 가용분획물의 농도 의존적으로 체재시간이 증가하는 양상을 보임을 확인하였다.

[199] 상기 실험결과로부터 모새나무 메탄올 조추출물 및 이의 가용분획물(에틸아세테이트, 메탄올, 물)이 마우스의 학습 및 기억력을 현저히 증가시킬 수 있음을 확인하였다(도 10a 및 도 10b).

[200]

[201] 실험예 5-2: 스코폴아민 유도 건망증모델에서의 수동회피실험을 통한 모세나무 추출물 또는 이의 분획물의 학습 및 기억력 개선 효과 확인

[202] 마우스를 각 군당 14 마리씩 5 군으로 나누었다. 제1군은 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수 투여군(대조군), 제2군은 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수 및 스코폴라민 투여군(양성대조군), 제3군 내지 제5군은 모세나무 추출물 또는 이의 가용분획물(에틸아세테이트)의 투여군(실험군)으로 하였다.

[203] 모세나무 추출물 또는 이의 물 가용 분획물을 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수에 용해시켜 6.25, 12.5 및 25 mg/kg의 용량으로 마우스에 경구투여하고, 30분 후에 스코폴아민 0.5 mg/kg을 피하주사 하였다. 또한 모세나무 추출물의 부탄올 또는 에틸아세테이트 분획물을 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수에 용해시켜 12.5, 25 및 50 mg/kg의 용량으로 마우스에 경구투여하고, 30분 후에 스코폴아민 0.5 mg/kg을 피하주사 하였다.

[204] 30분 후에 마우스를 스텝-스루(step-through) 장치에 넣어 어두운 상자로 들어가면 0.25mA의 전기 충격을 3초 동안 가하여 학습(training)시켰다. 24 시간 후에 마우스를 다시 밝은 상자에 넣어 검은 상자에 들어가기까지의 체제시간을 측정하여 스코폴아민 유도 건망증에 대한 학습 및 기억력의 지표로 하였다. 이때 마우스의 컷-오프 시간(cut-off time)은 300초로 하여 대조군과 비교하였다.

[205]

[206] 그 결과, 스코폴라민을 투여하지 않은 제1군(대조군)의 마우스에 비하여 스코폴라민을 투여한 제2군(양성대조군)에서 체제시간이 단축됨으로써 건망증이 유도되었음을 확인하였다.

[207] 한편, 모세나무 추출물 또는 이의 에틸아세테이트, 부탄올, 물 가용분획물을 각각 투여한 제3군 내지 제5군(실험군)의 마우스에서 체제시간이 점차 증가되었음을 확인하였다. 상기 실험결과를 통하여 모세나무 메탄올 조추출물 또는 이의 가용 분획물이 기억력 손상을 효과적으로 예방할 수 있음을 확인하였다(도 11a 및 도 11b).

[208]

[209] 실험예 5-3: A $\beta$ <sub>25-35</sub> 유도 치매모델에서의 수동회피실험을 통한 모세나무 추출물의 학습 및 기억력 개선 효과 확인

[210] 마우스를 각 군당 11~12 마리씩 5 군으로 나누었다. 제1군은 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수 투여군(대조군), 제2군은 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수 및 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 투여군(양성대조군), 제3군 내지 제5군은 농도별 모세나무 메탄올 추출물의 투여군(실험군)으로 하였다.

[211] 모세나무 메탄올 추출물을 각각 10% Tween 20을 포함하고 있는 증류수에 용해시켜 6.25, 12.5 및 25 mg/kg의 용량으로 마우스에 경구투여하고, 1시간 후에 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 6 nmol을 좌측 뇌실에 입체정위 기구를 사용하여 주사하였다. 5일 동안 각각의 군들에 10% Tween 20을 포함하여 모세나무 추출물 6.25, 12.5 및 25

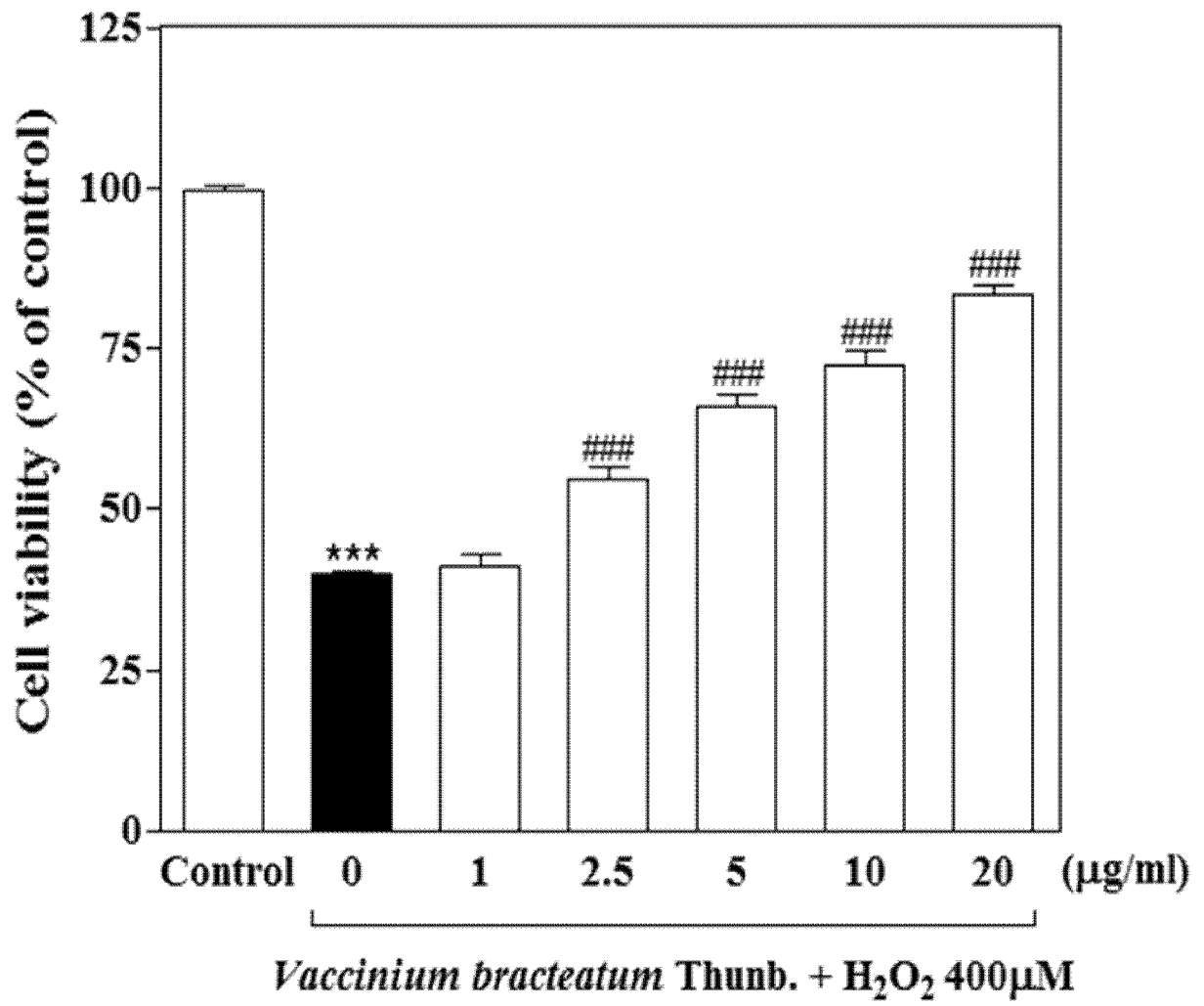
mg/kg을 투여하였다.

- [212] 1시간 후에 마우스를 스텝-스루(step-through) 장치에 넣어 어두운 상자로 들어가면 0.5mA의 전기 충격을 3초 동안 가하여 학습(training)시켰다. 24 시간 후에 마우스를 다시 밝은 상자에 넣어 검은 상자에 들어가기까지의 체제시간을 측정하여  $A\beta_{25-35}$  유도 치매에 대한 학습 및 기억력의 지표로 하였다. 이때 마우스의 컷-오프 시간(cut-off time)은 300초로 하여 대조군과 비교하였다.
- [213]
- [214] 그 결과,  $A\beta_{25-35}$ 을 투여하지 않은 제1군(대조군)의 마우스의 체제시간(136초)에 비하여  $A\beta_{25-35}$ 을 투여한 제2군(양성대조군)에서 체제시간(58초)이 단축됨으로써 건망증이 현저하게 유도되었음을 확인하였다( $p<0.01$ ).
- [215] 한편, 모세나무 메탄올 추출물 6.25 mg/kg 투여군, 12.5 mg/kg 투여군 및 25 mg/kg 투여군은 각각 169초, 94초, 및 62초의 체제시간을 보여  $A\beta_{25-35}$  유도 치매모델군(양성대조군)에 비하여 현저한 체제시간의 증가효과를 보였다.
- [216] 상기 실험결과를 통하여 모세나무 추출물이 알츠하이머성 기억력 손상을 효과적으로 예방할 수 있음을 재차 확인하였다(도 13).

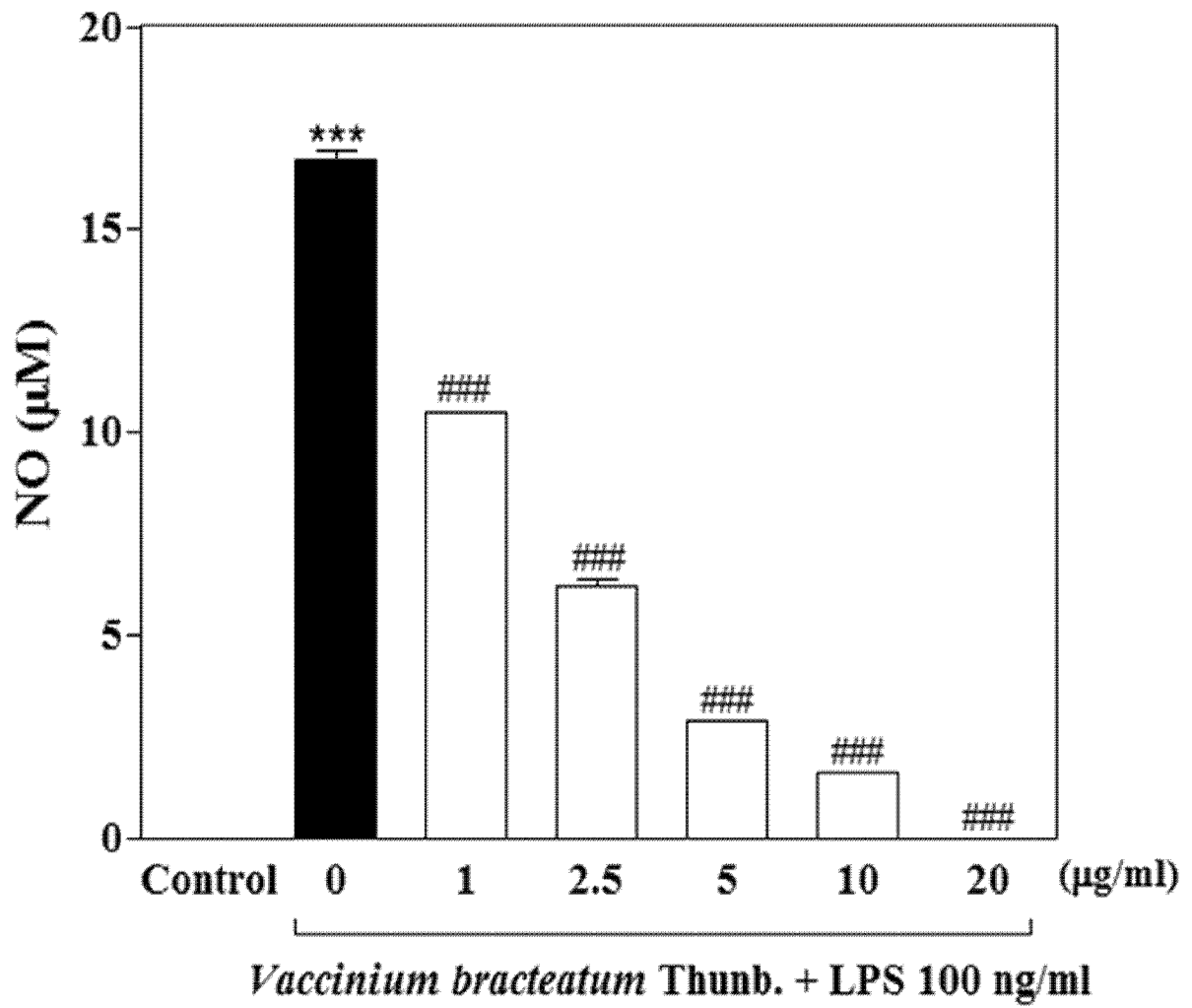
## 청구범위

- [청구항 1] 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 추출물은 모새나무를 물, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>의 저급알콜 및 이들의 혼합용매로 구성된 균으로부터 선택되는 용매로 추출하여 수득한 것인 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 추출물은 모새나무의 메탄올로 추출한 것인 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 분획물은 모새나무 메탄올 추출물을 물, 에틸아세테이트 또는 부탄올을 사용하여 분획하여 수득한 것인 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌신경 질환은 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 크로이츠펠트야콥병, 뇌졸중, 다발성 경화증, 학습장애, 인지장애 및 기억력 손상으로 이루어진 군에서 선택된 것인 조성물.
- [청구항 6] 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 추출물은 모새나무를 물, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>의 저급알콜 및 이들의 혼합용매로 구성된 균으로부터 선택되는 용매로 추출하여 수득한 것인 조성물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 추출물은 모새나무의 메탄올로 추출한 것인 조성물.
- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 분획물은 모새나무 메탄올 추출물을 물, 에틸아세테이트 또는 부탄올을 사용하여 분획하여 수득한 것인 조성물.
- [청구항 10] 제6항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌신경 질환은 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 크로이츠펠트야콥병, 뇌졸중, 다발성 경화증, 학습장애, 인지장애 및 기억력 손상으로 이루어진 군에서 선택된 것인 조성물.
- [청구항 11] 모새나무(*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 학습 능력 또는 기억력 증진 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 12] 제1항 내지 제5항의 조성물 중 어느 한 항의 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경염증 또는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료방법.

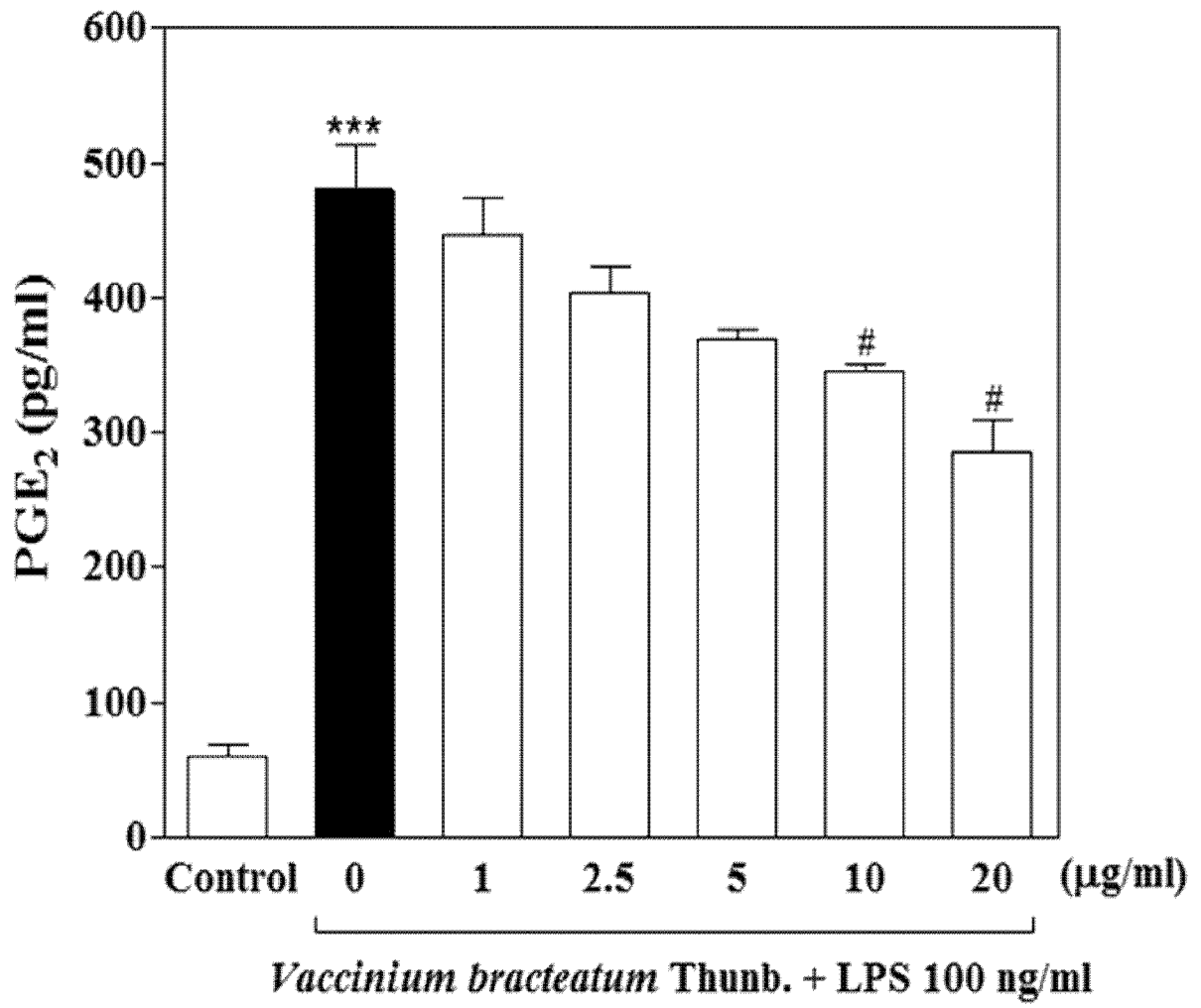
[Fig. 1]



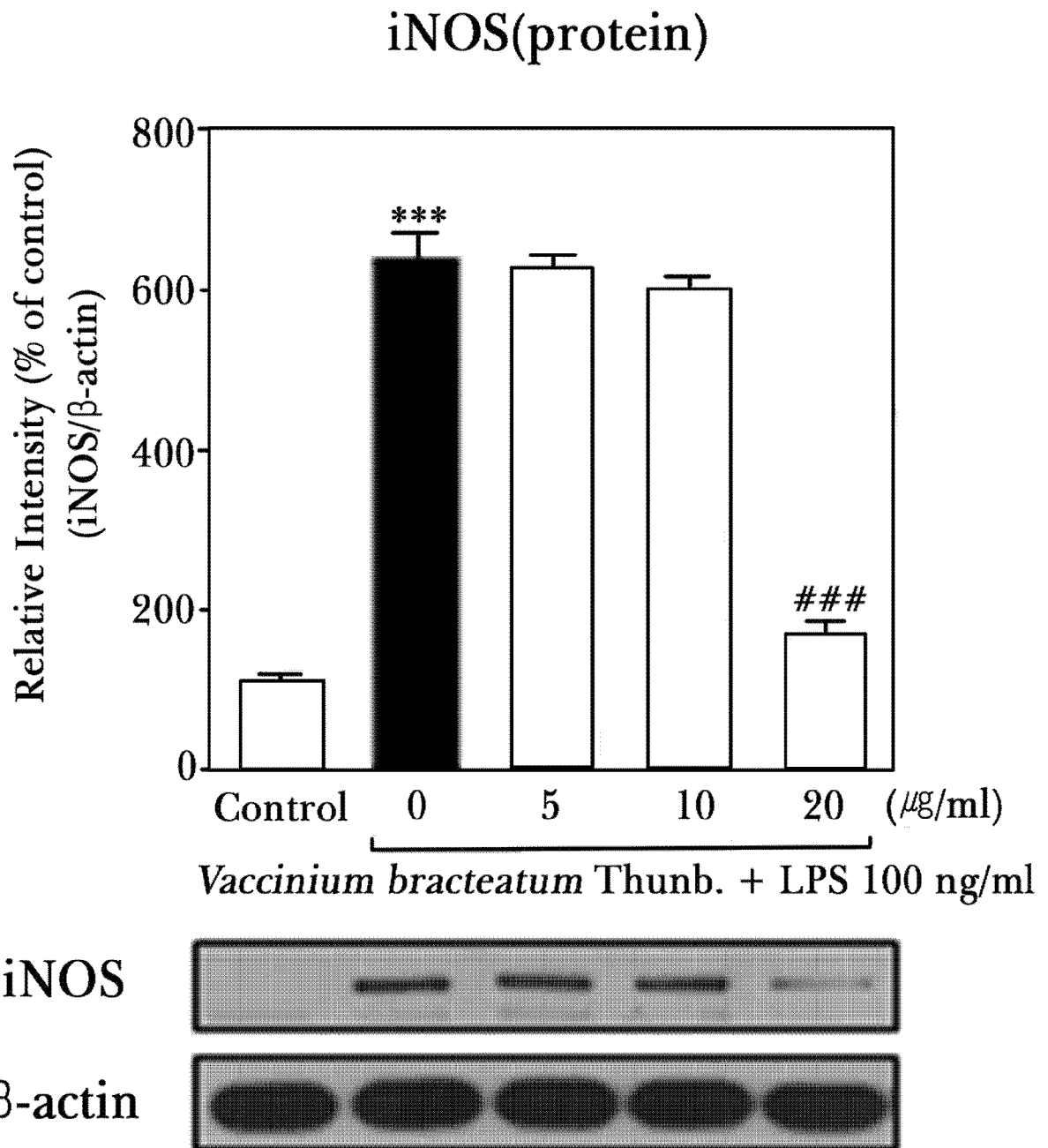
[Fig. 2]



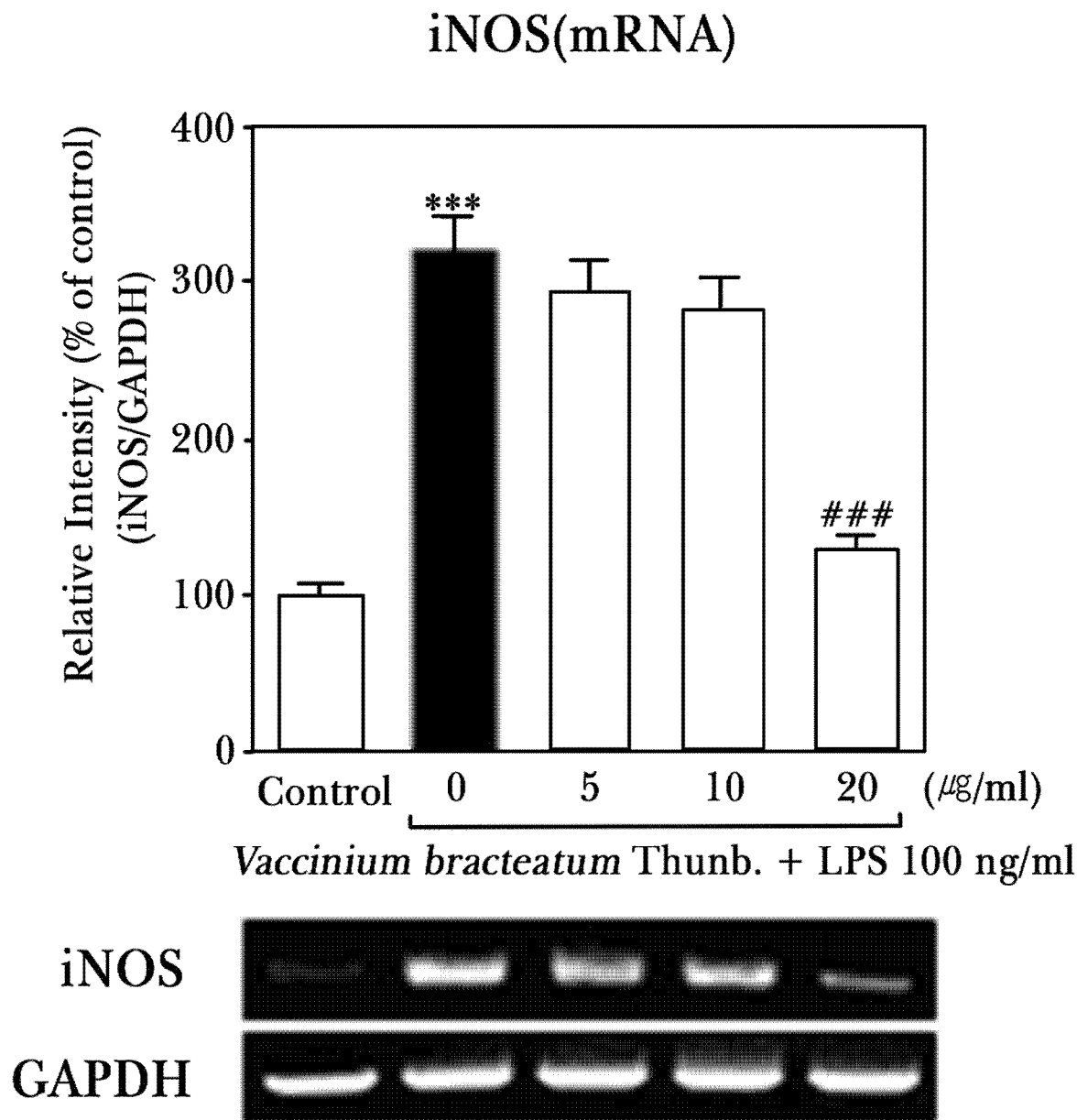
[Fig. 3]



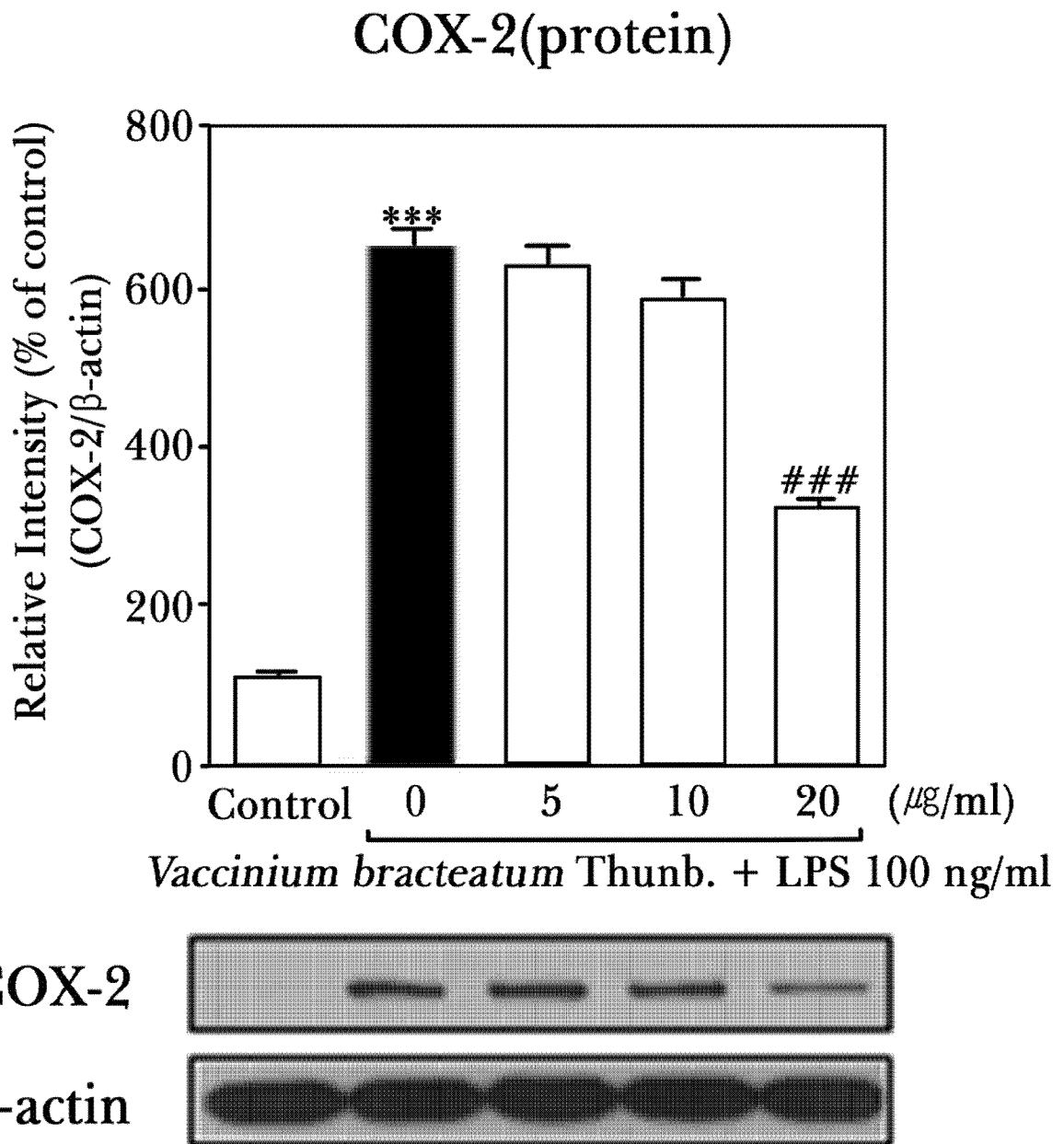
[Fig. 4a]



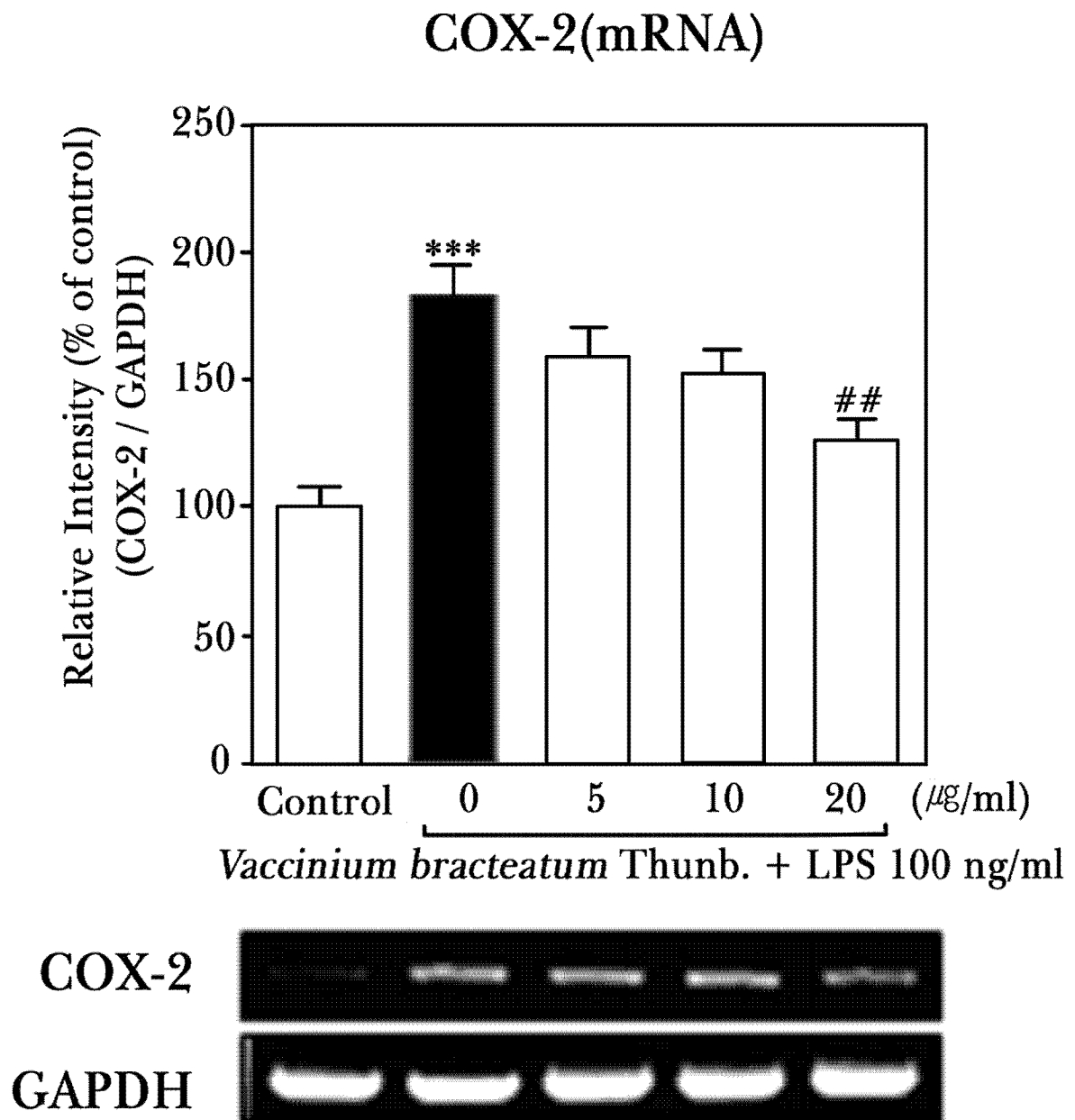
[Fig. 4b]



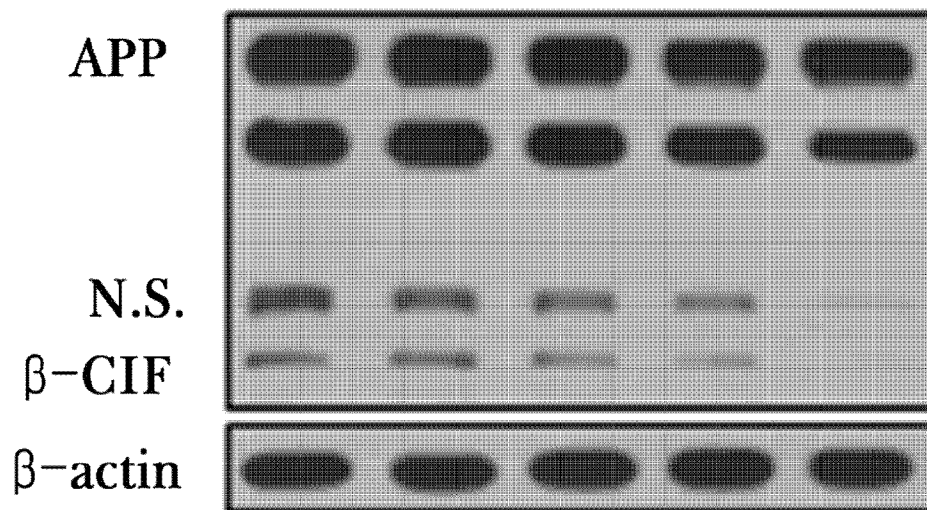
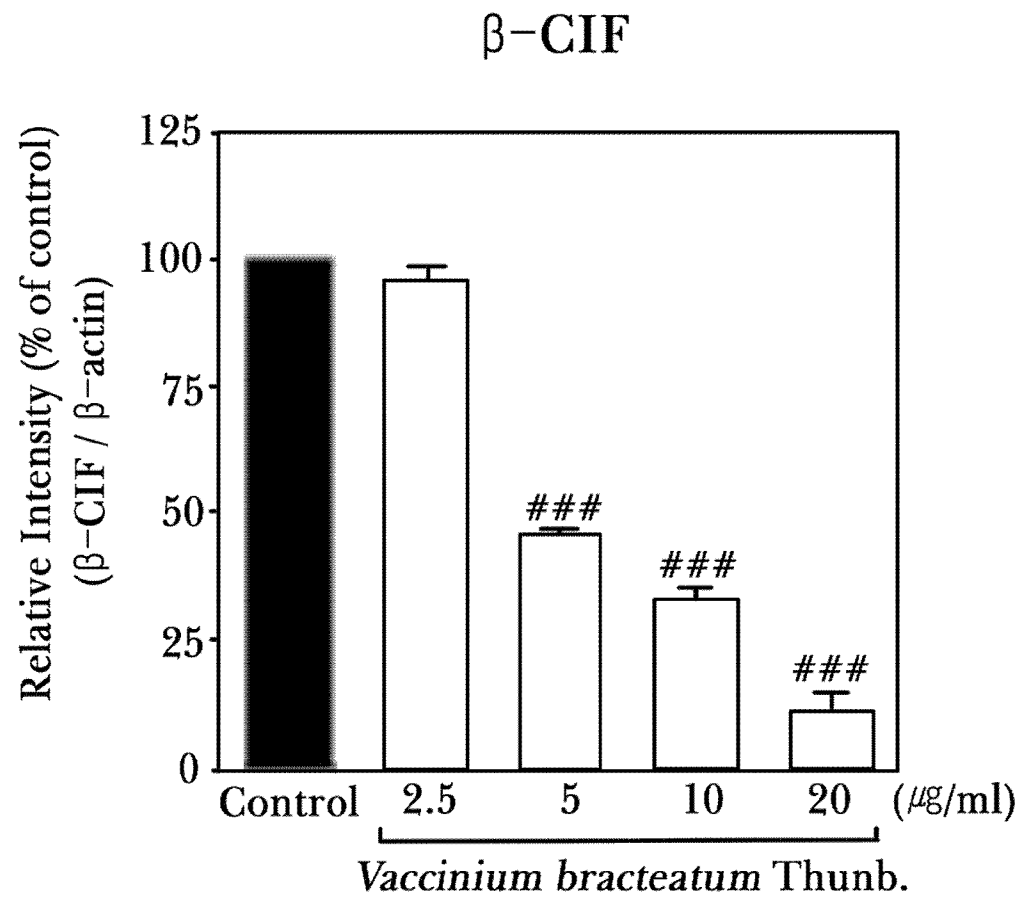
[Fig. 5a]



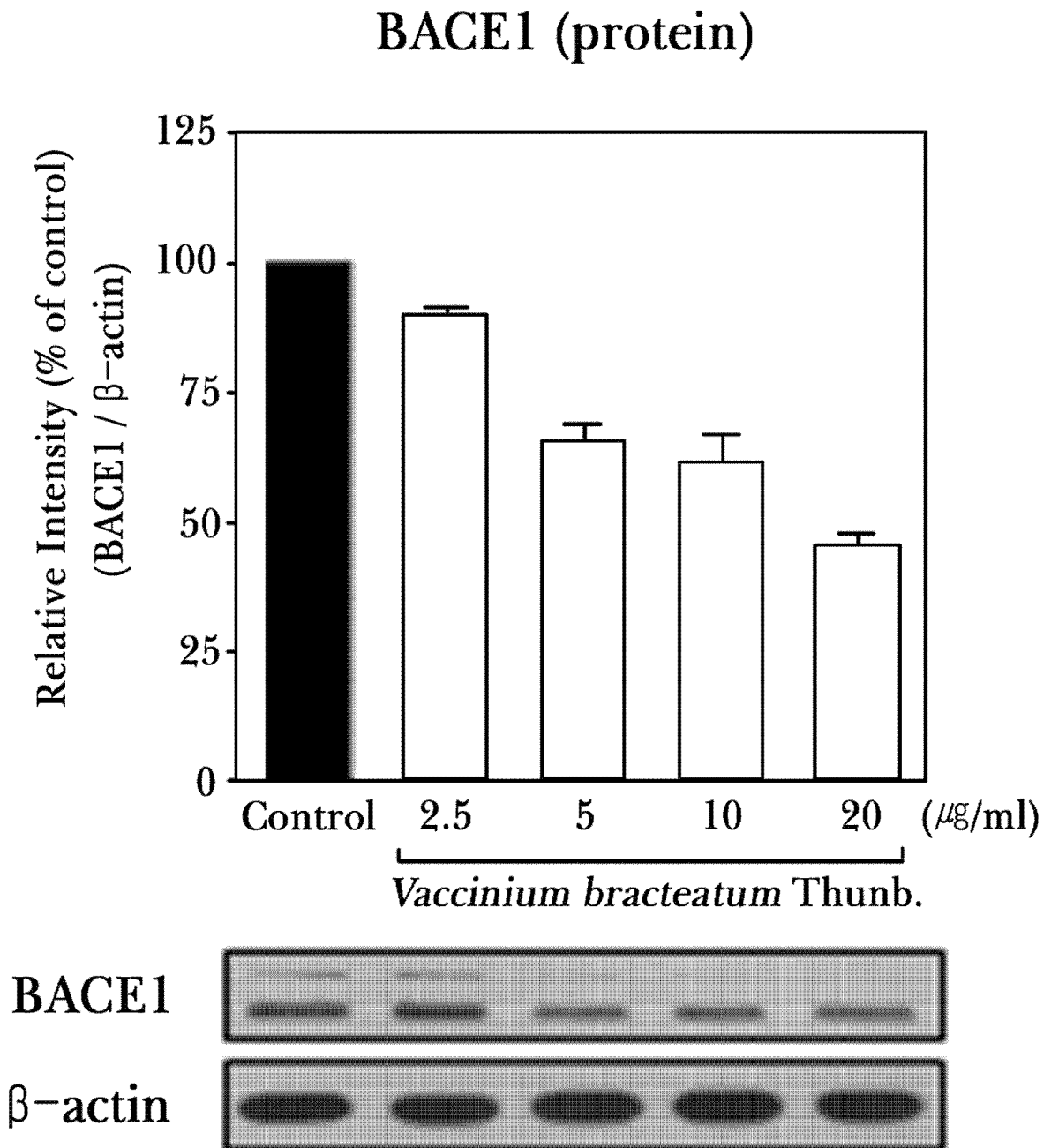
[Fig. 5b]



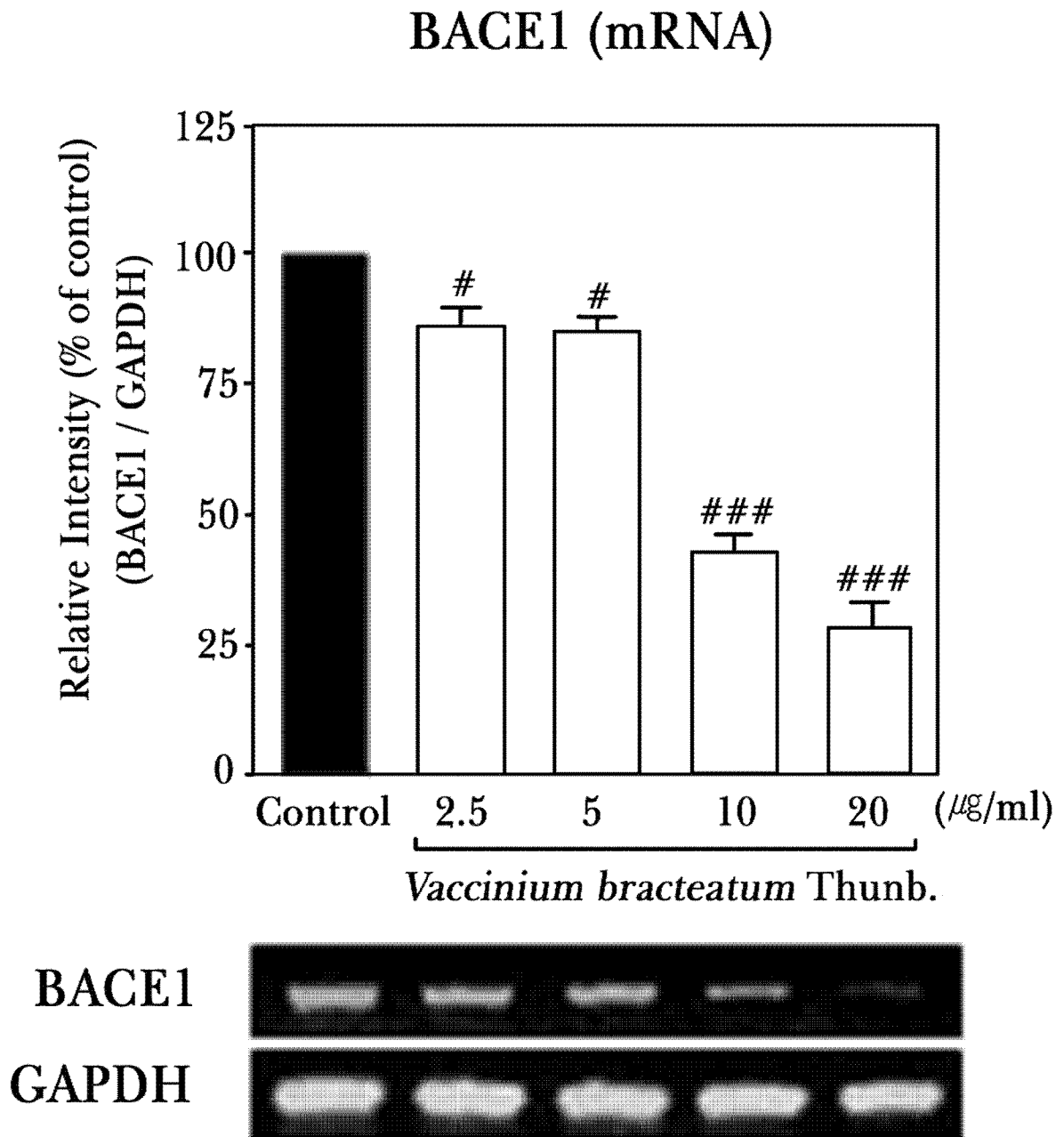
[Fig. 6]



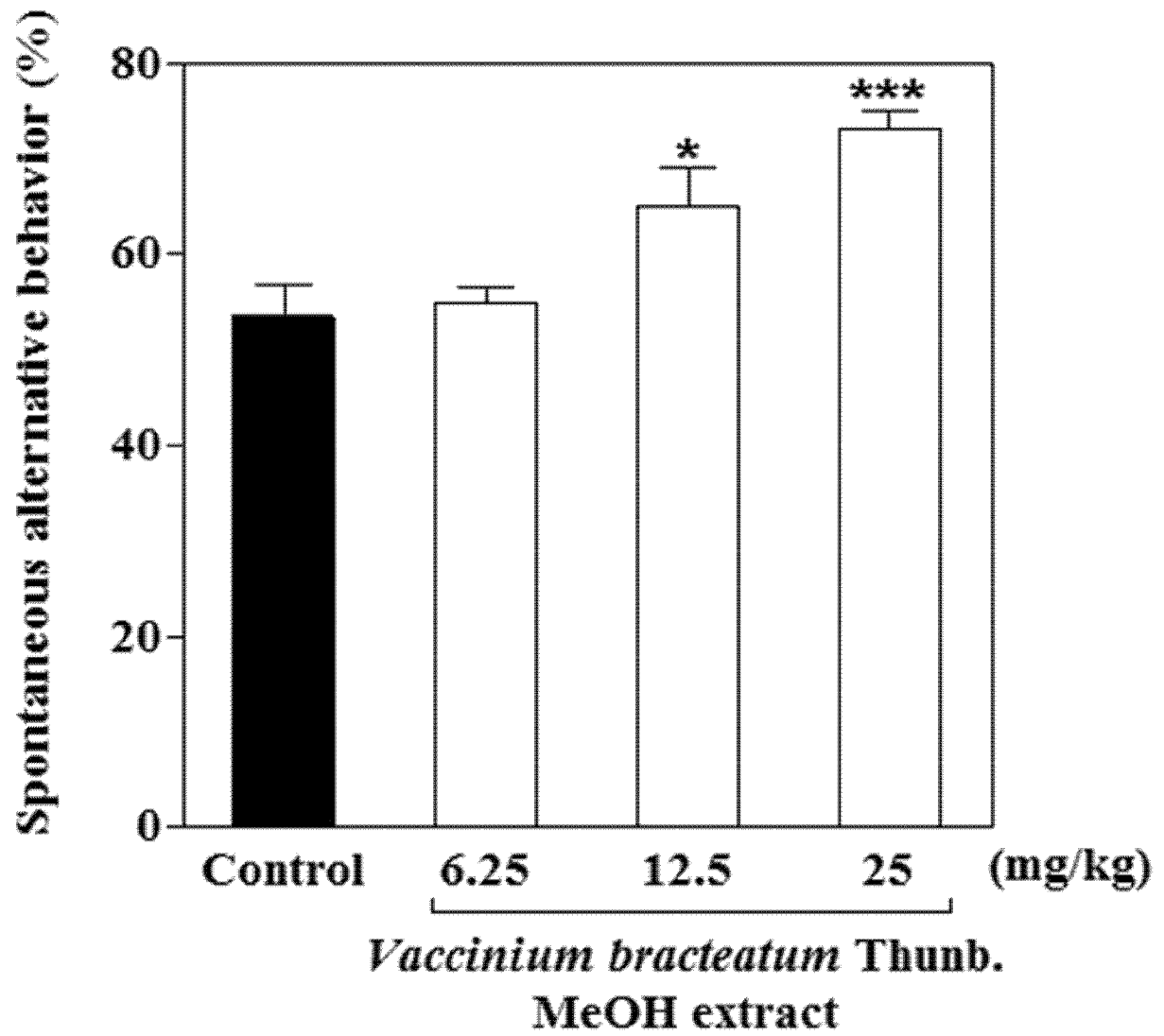
[Fig. 7a]



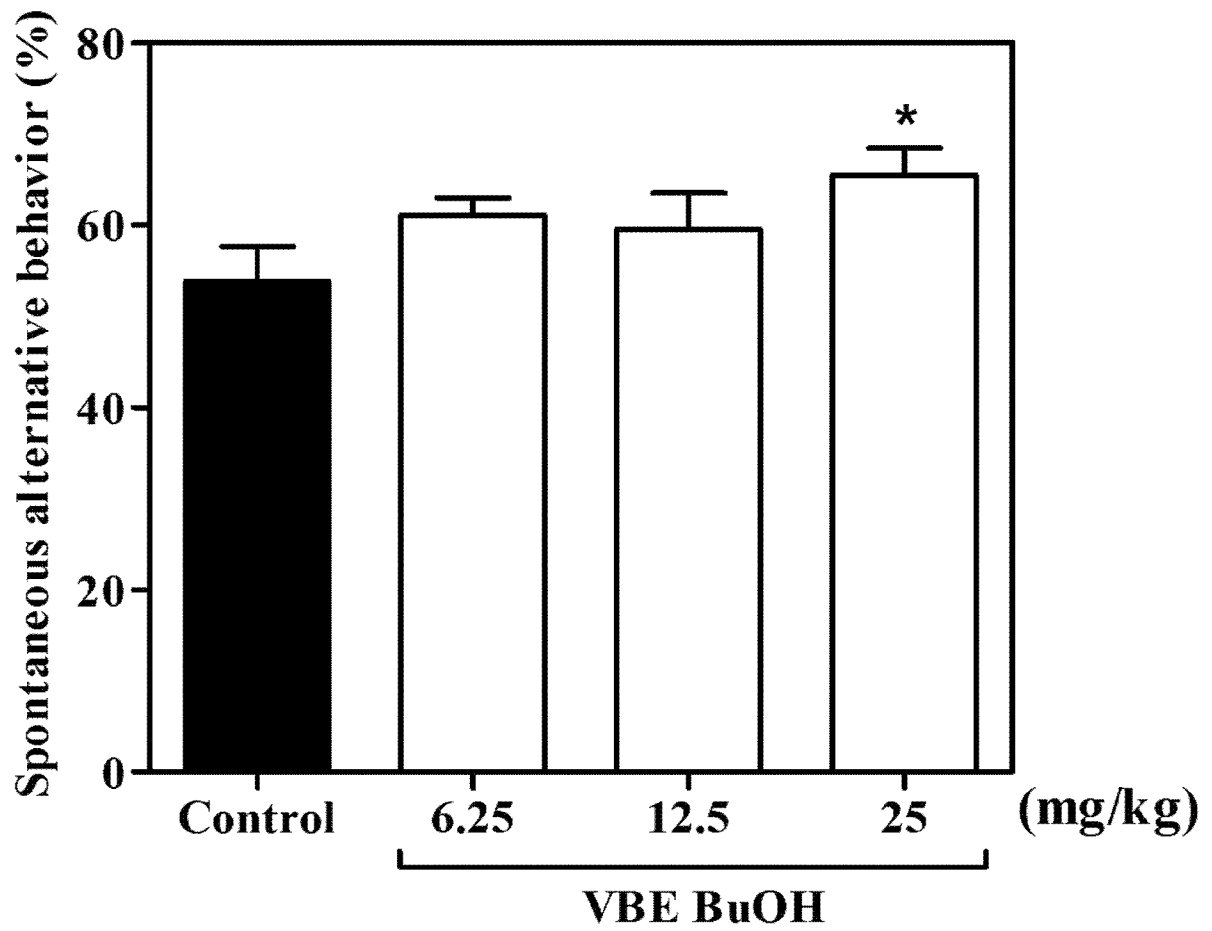
[Fig. 7b]



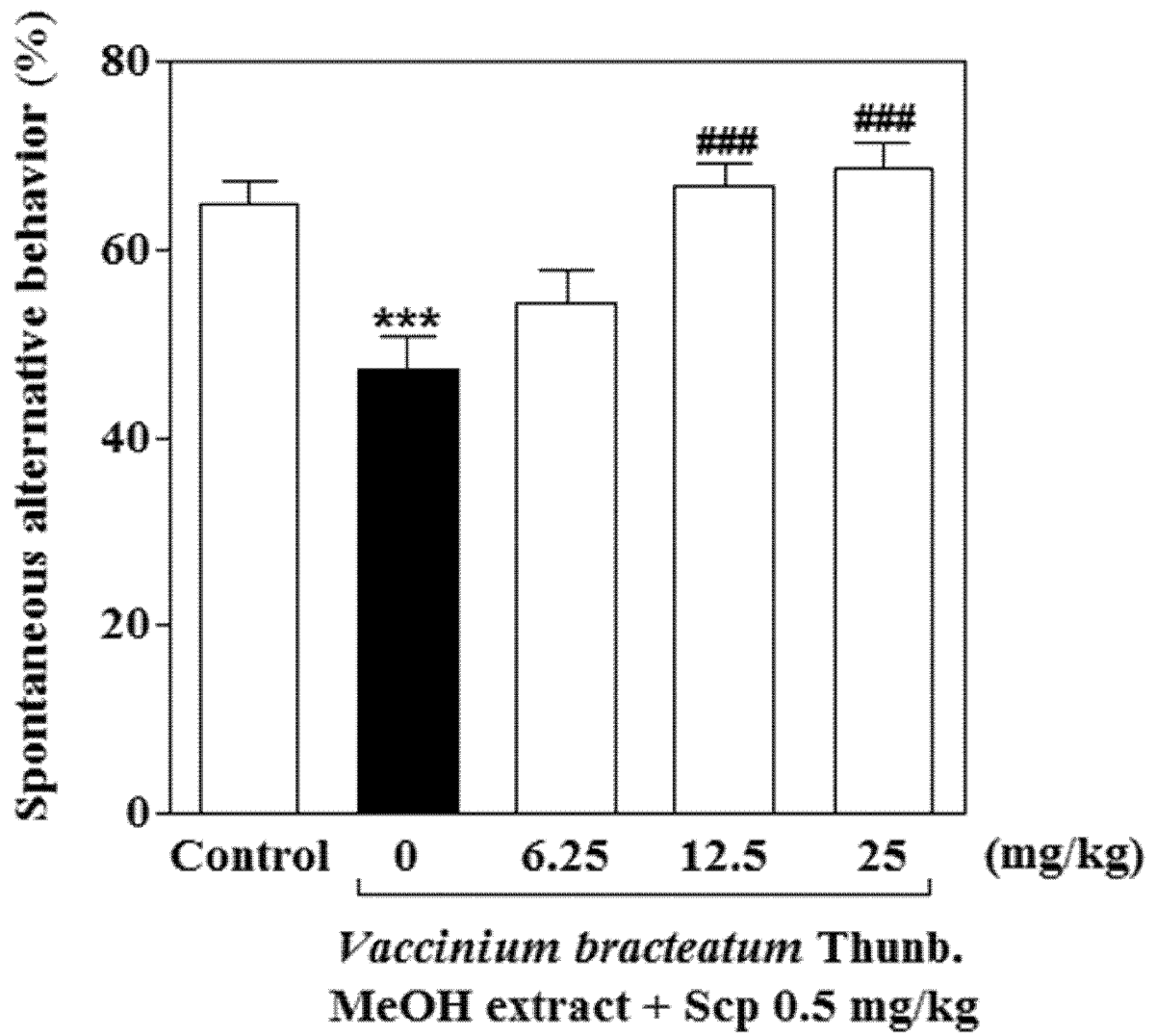
[Fig. 8a]



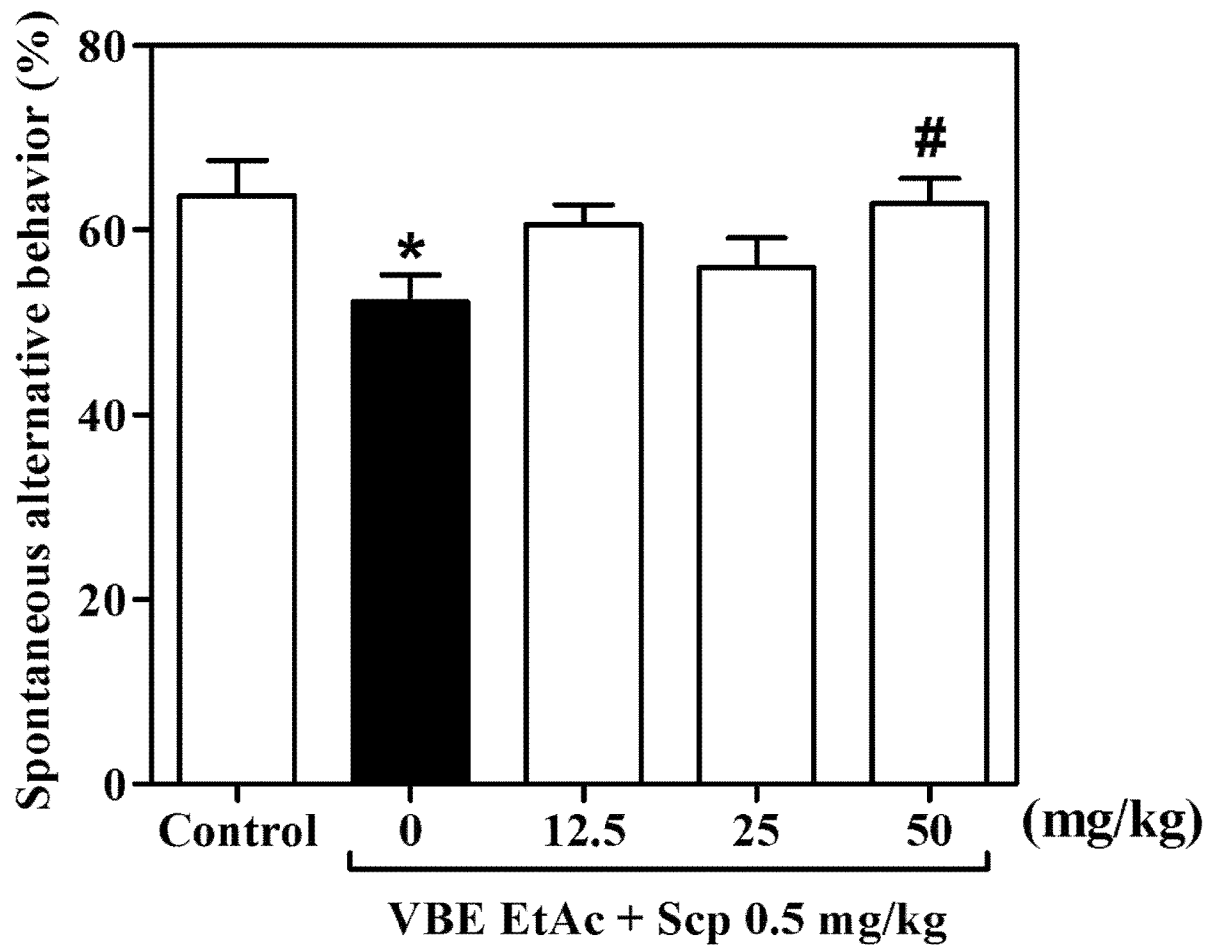
[Fig. 8b]



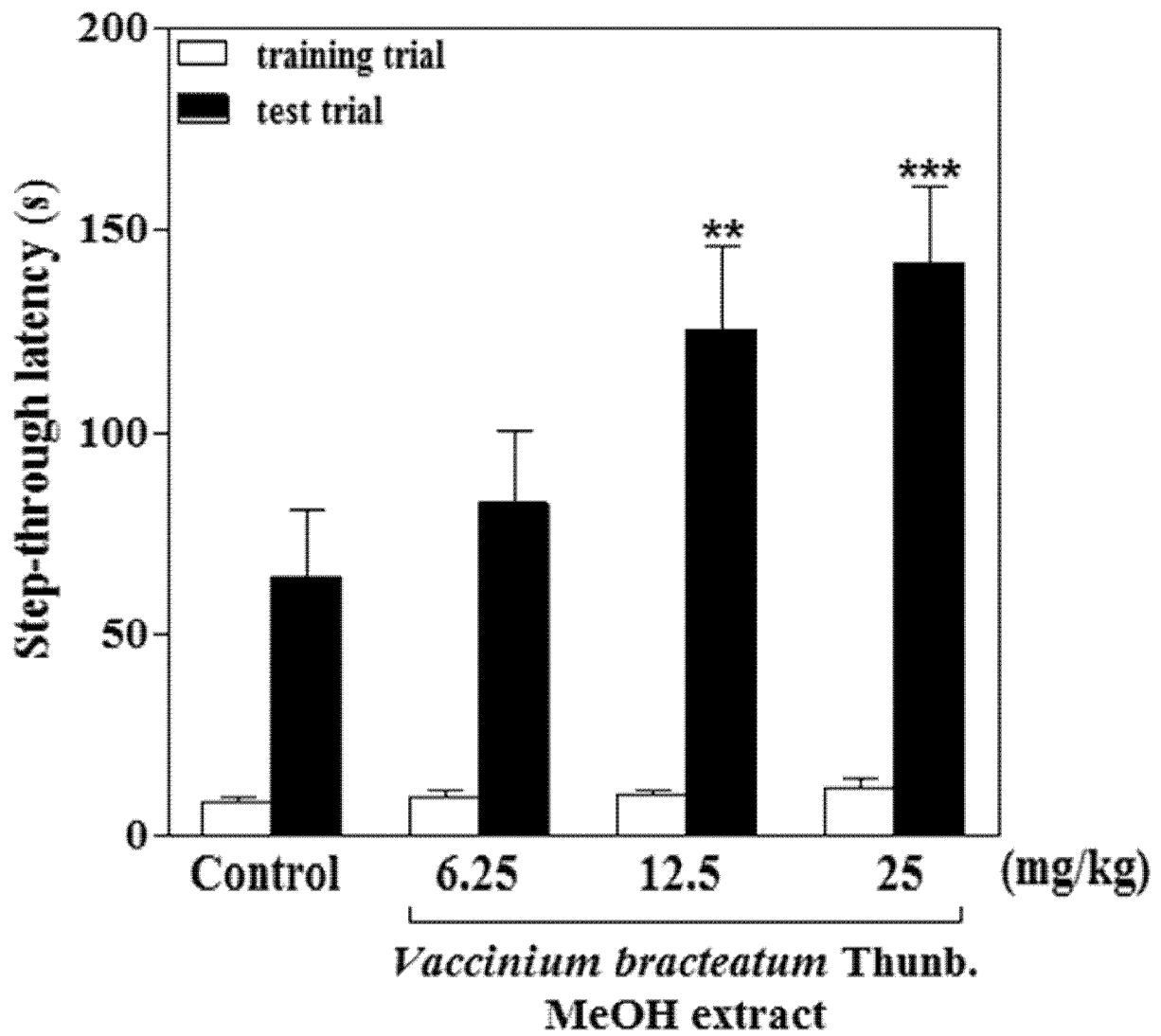
[Fig. 9a]



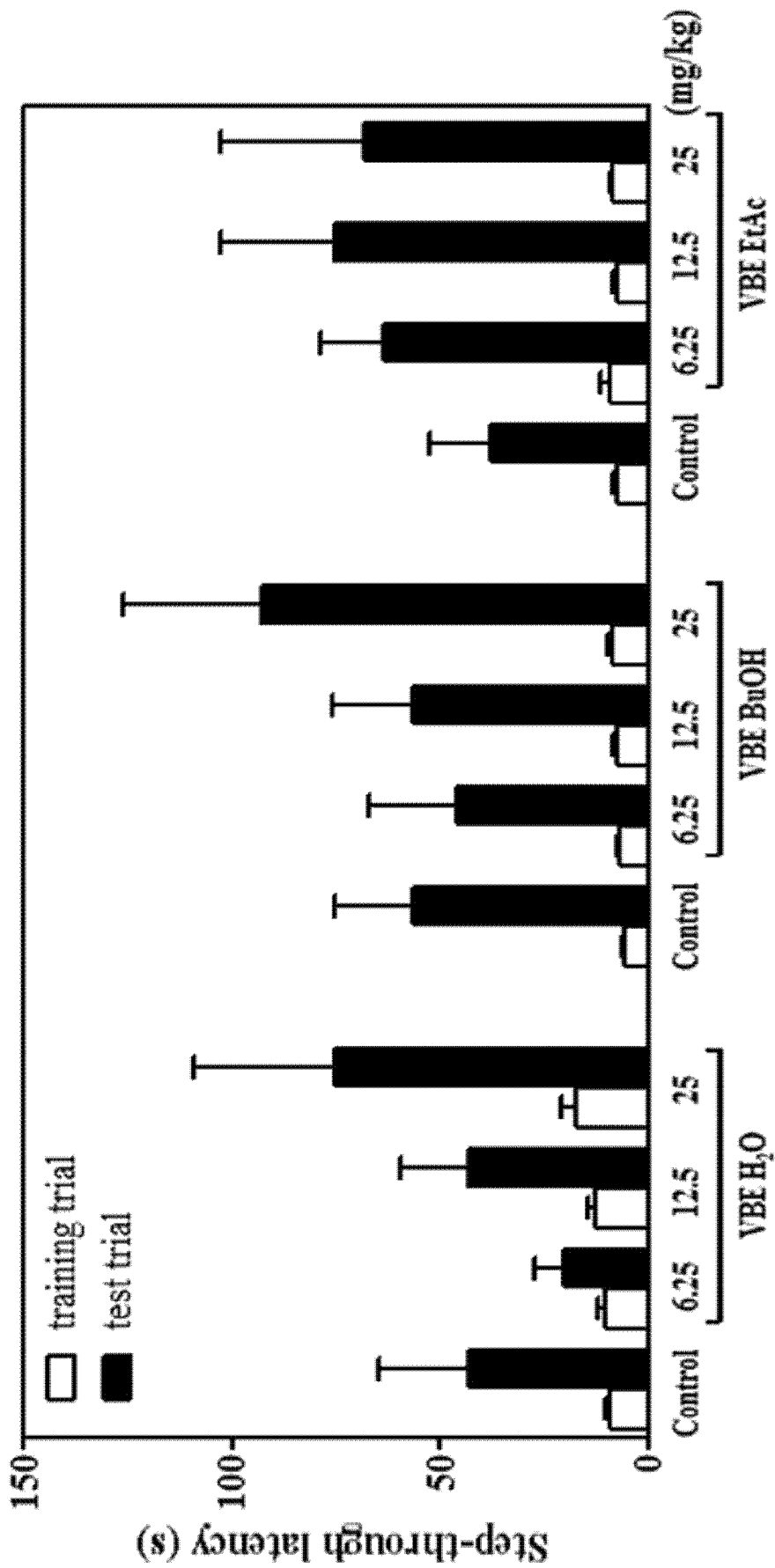
[Fig. 9b]



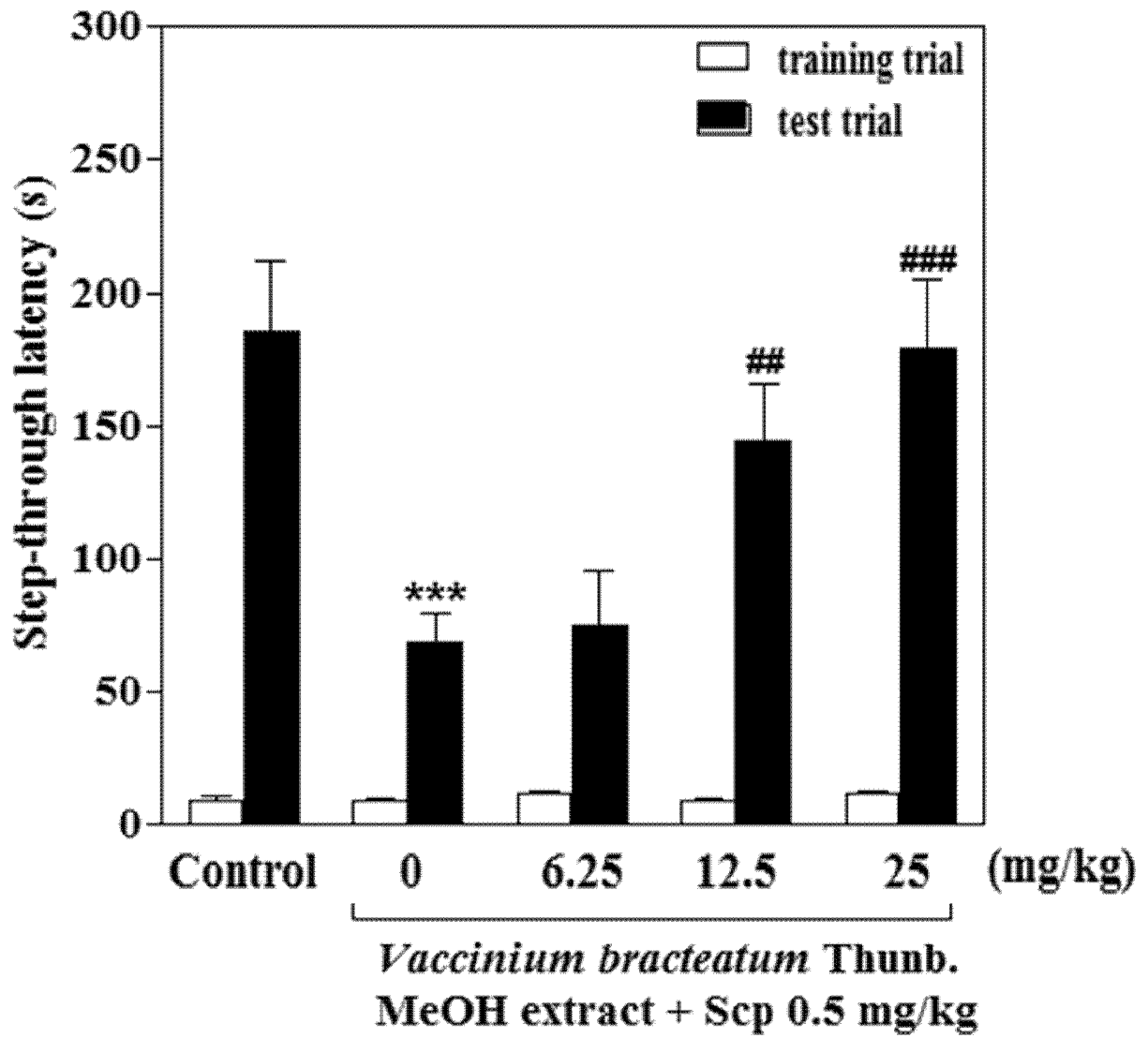
[Fig. 10a]



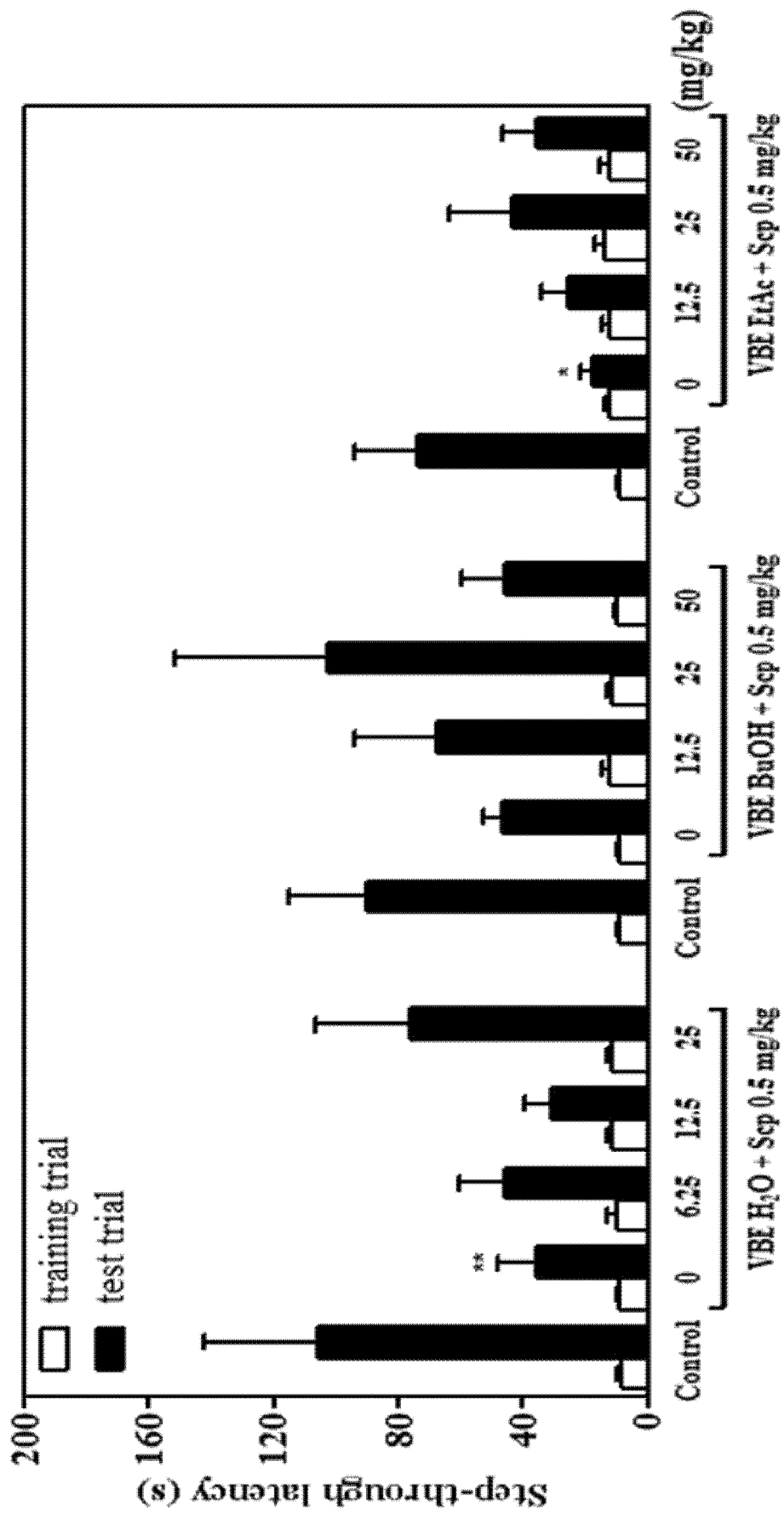
[Fig. 10b]



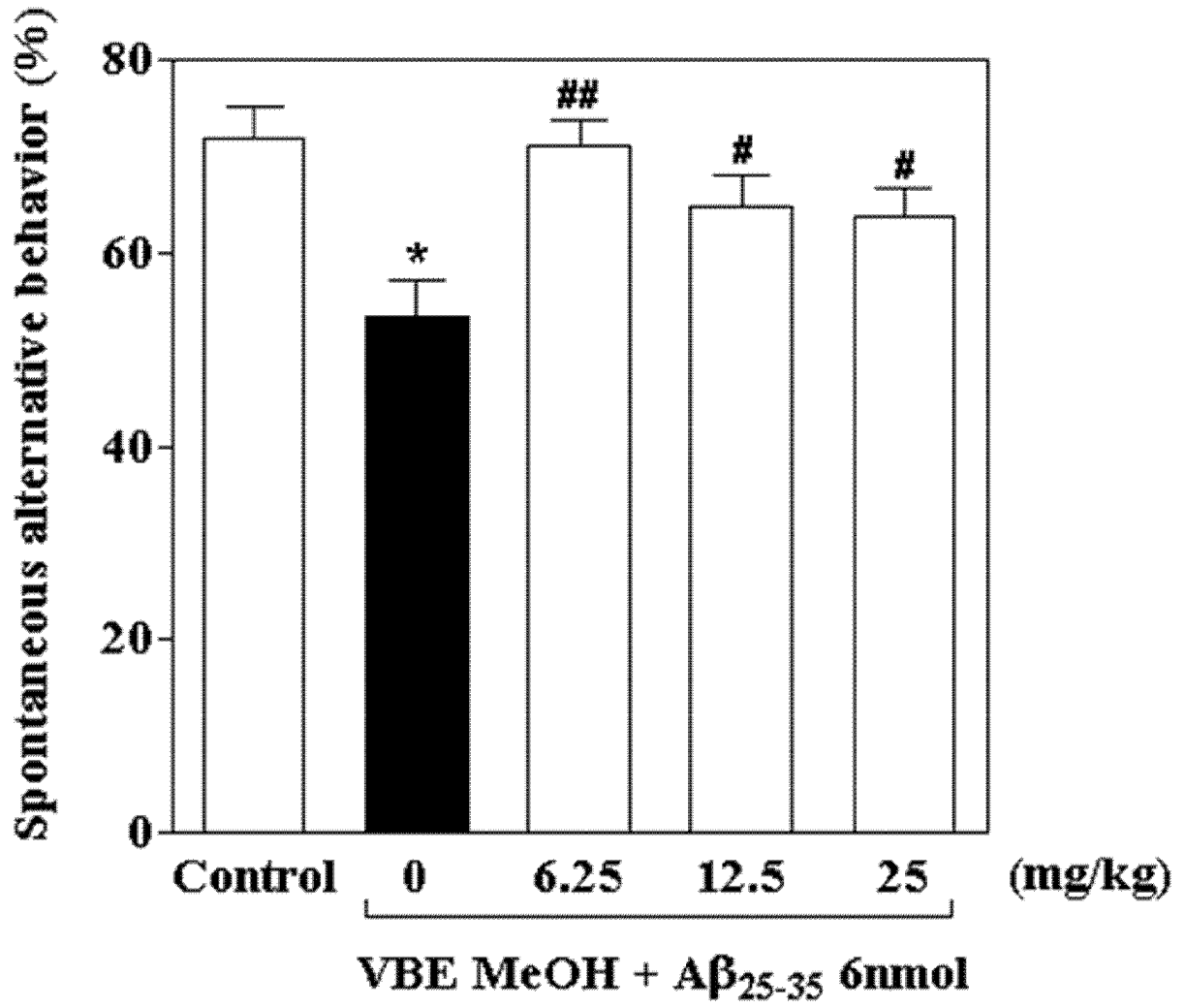
[Fig. 11a]



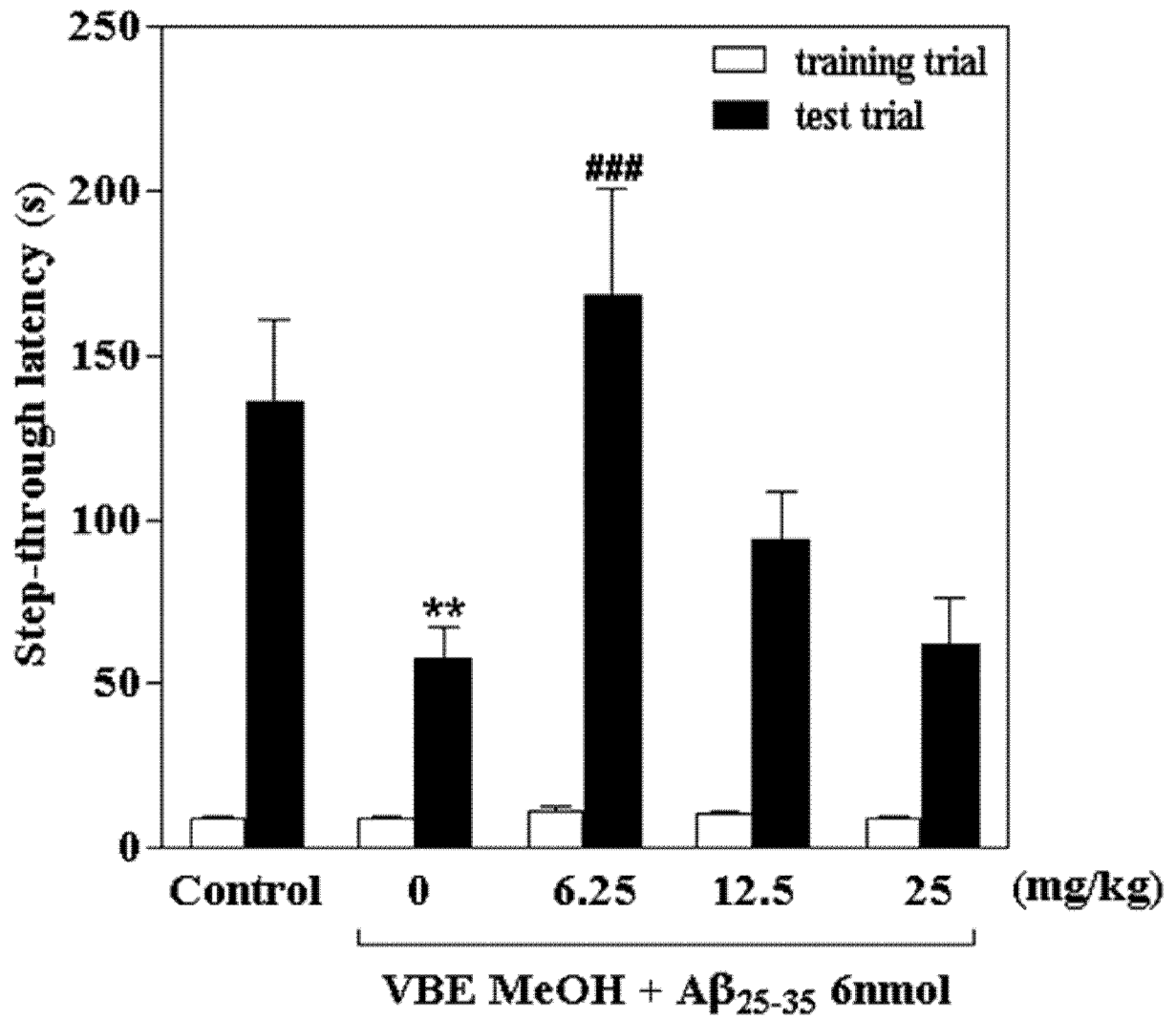
[Fig. 11b]



[Fig. 12]




[Fig. 13]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/008976

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>A61K 36/45(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61P 25/16(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 36/45; A61P 25/28; A61P 25/16  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: extract of <i>Vaccinium bracteatum</i> , neuroinflammation, neurodegenerative diseases, learning ability, memory, COX-2		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LANDA, P. et al., In vitro anti-proliferative and anti-inflammatory activity of leaf and fruit extracts from <i>Vaccinium bracteatum</i> Thunb., Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, January 2014, vol. 27, no. 1, pages 103-106 See pages 103, 105.	1-11
Y	AISEN, P. S., Evaluation of selective COX-2 inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, Journal of Pain and Symptom Management, 2002, vol. 23, no. 4S, pages S35-S40 See abstract and page S38.	1-11
A	TSUDA, H. et al., Antioxidant activities and anti-cancer cell proliferation properties of Natsuhaze ( <i>Vaccinium oldhamii</i> Miq.), Shashanbo ( <i>V. bracteatum</i> Thunb.) and blueberry cultivars, Plants, 2013, vol. 2, pages 57-71 See the entire document.	1-11
A	WANG, L. et al., Anti-diabetic activity of <i>Vaccinium bracteatum</i> Thunb. leaves' polysaccharide in STZ-induced diabetic mice, International Journal of Biological Macromolecules, 2013, vol. 61, pages 317-321 See the entire document.	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search <b>29 OCTOBER 2015 (29.10.2015)</b>	Date of mailing of the international search report <b>29 OCTOBER 2015 (29.10.2015)</b>	
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer  Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/008976

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG, L. et al., Effect of Vaccinium bracteatum Thunb. leaves extract on blood glucose and plasma lipid levels in streptozotocin-induced diabetic mice, Journal of Ethnopharmacology, 2010, vol. 130, pages 465-469 See the entire document.	1-11

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 12  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 12 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2015/008976**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> A61K 36/45(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61P 25/16(2006.01)i		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/45; A61P 25/28; A61P 25/16  조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 모새나무 추출물, 신경염증, 퇴행성 뇌신경 질환, 학습 능력, 기억력, COX-2		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	LANDA, P. 등, In vitro anti-proliferative and anti-inflammatory activity of leaf and fruit extracts from Vaccinium bracteatum Thunb., Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014년 1월, 27권, 1호, 페이지 103-106 페이지 103, 105 참조.	1-11
Y	AISEN, P. S., Evaluation of selective COX-2 inhibitors for the treatment of Alzheimer`s disease, Journal of Pain and Symptom Management, 2002년, 23권, 4S호, 페이지 S35-S40 초록 및 페이지 S38 참조.	1-11
A	TSUDA, H. 등, Antioxidant activities and anti-cancer cell proliferation properties of Natsuhaze (Vaccinium oldhamii Miq.), Shashanbo (V. bracteatum Thunb.) and blueberry cultivars, Plants, 2013년, 2권, 페이지 57-71 전문 참조.	1-11
A	WANG, L. 등, Anti-diabetic activity of Vaccinium bracteatum Thunb. leaves` polysaccharide in STZ-induced diabetic mice, International Journal of Biological Macromolecules, 2013년, 61권, 페이지 317-321 전문 참조.	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2015년 10월 29일 (29.10.2015)	국제조사보고서 발송일 2015년 10월 29일 (29.10.2015)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관  이정아  전화번호 +82-42-481-8740	

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	<p>WANG, L. 등, Effect of Vaccinium bracteatum Thunb. leaves extract on blood glucose and plasma lipid levels in streptozotocin-induced diabetic mice, Journal of Ethnopharmacology, 2010년, 130권, 페이지 465-469                      전문 참조.</p>	1-11

**제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)**

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- 1.  청구항: 12  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
청구항 제12항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치치방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 2.  청구항:  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- 3.  청구항:  
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

**제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)**

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

- 1.  출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
- 2.  추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
- 3.  출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
- 4.  출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에  
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음